

D5. Aula final

(PPGFQM-UFRJ / 2021)

DESCOBERTA & DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

François Noël

fgagnoel@gmail.com



LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



ESTRUTURA DA AULA

OBJETIVO: visão geral, atual e crítica do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, com ênfase nas etapas de descoberta e estudos pré-clínicos

TÓPICOS:

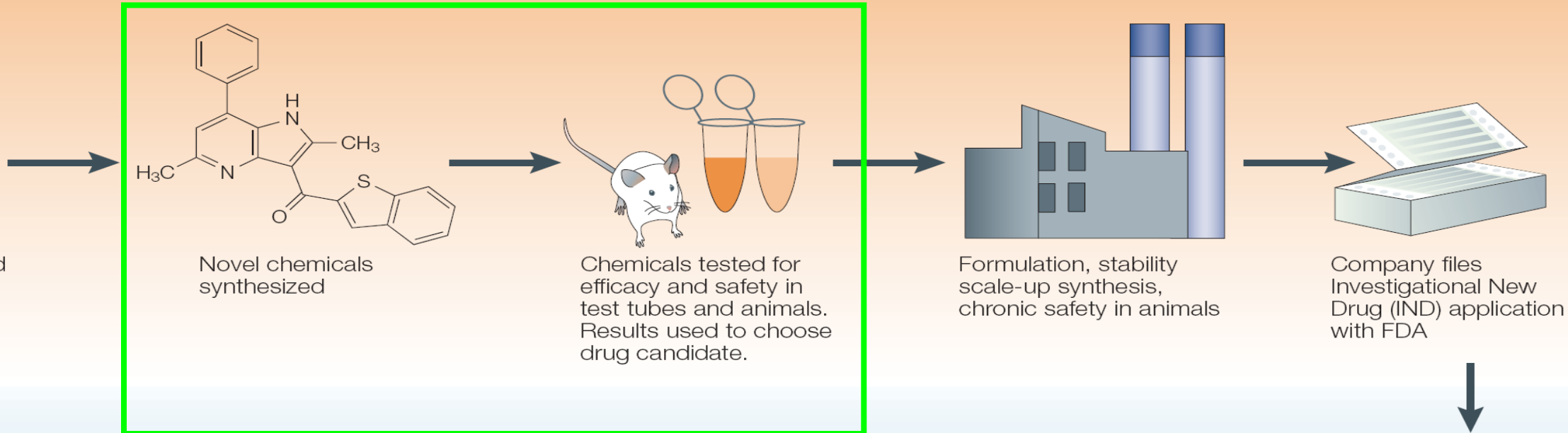
- **DD&D: introdução e desafios**
 - Estratégias para planejamento sintético
 - Tipos de ensaios farmacológicos
-
- Ensaios a serem realizados (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*), com fluxograma



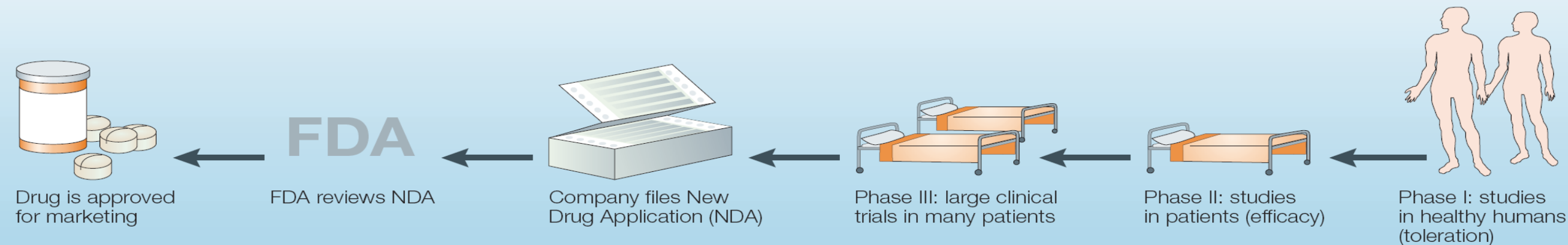
Abordagem quantitativa com discussão sobre os valores “desejados”

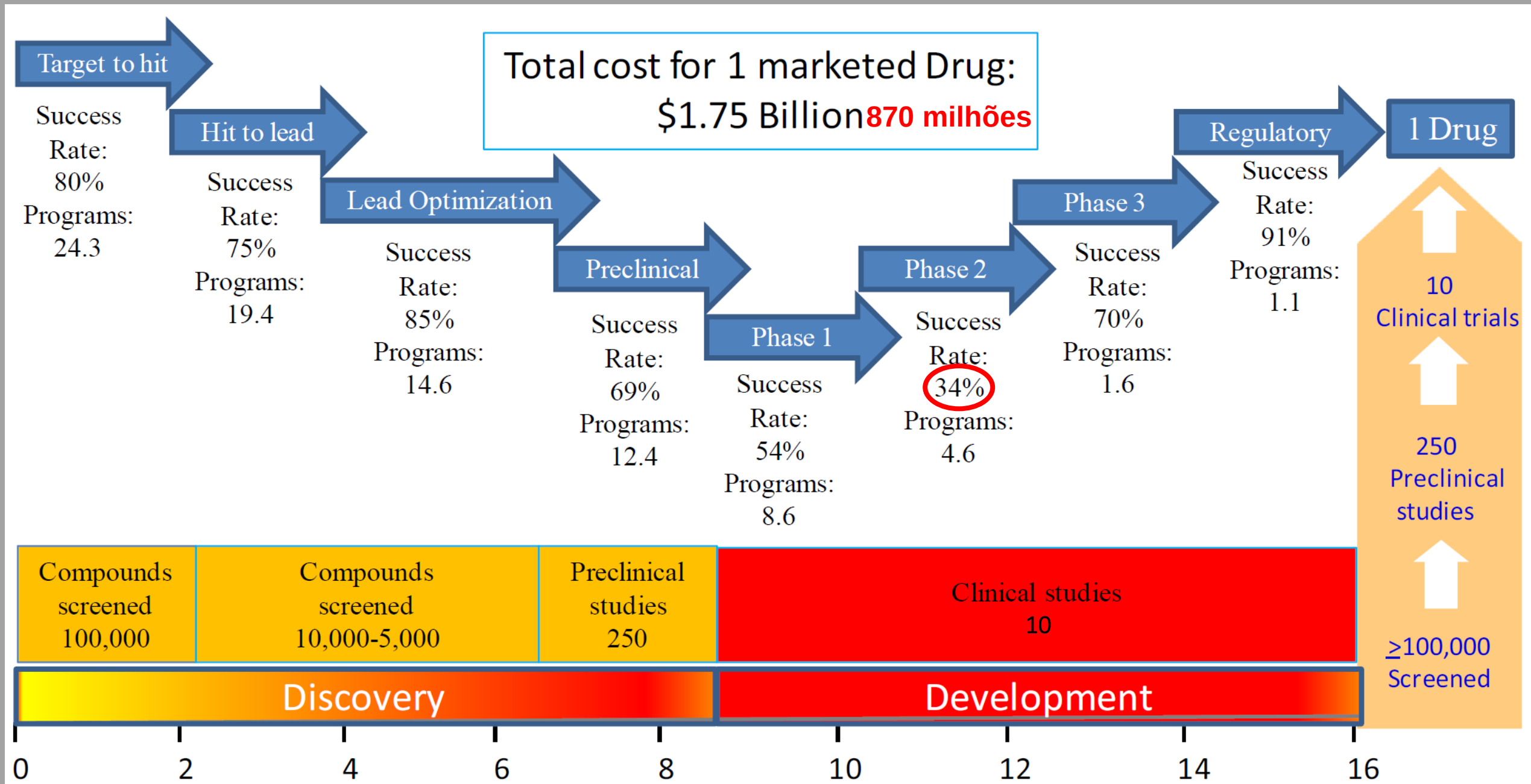
DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Preclinical studies



Clinical studies





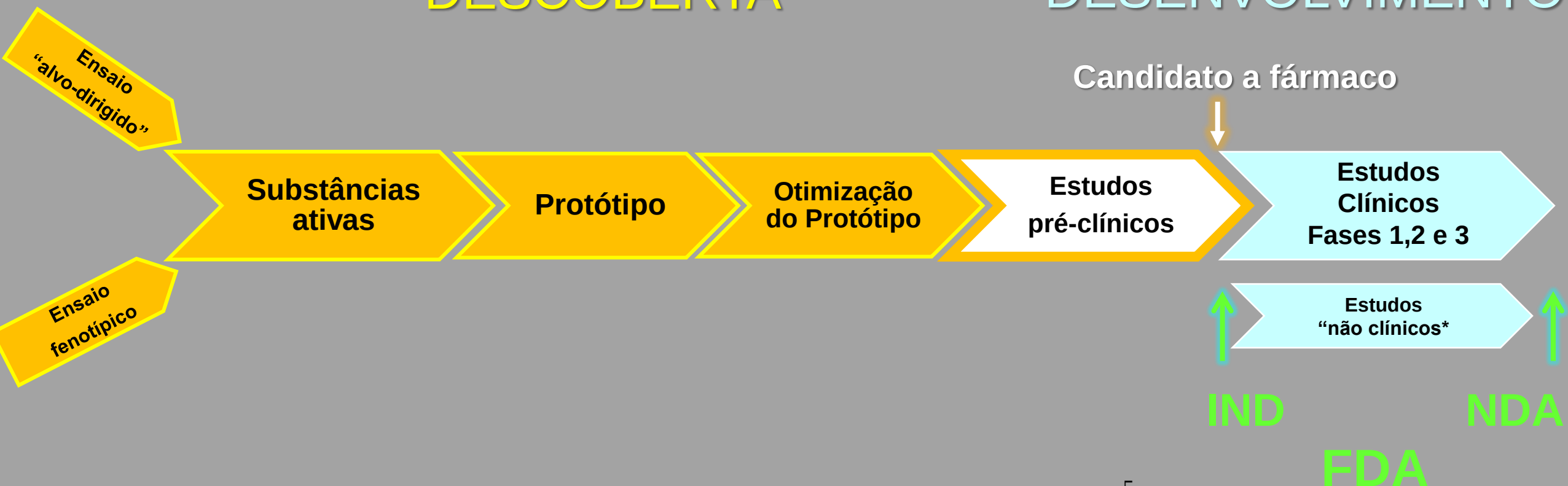


MUITA CONFUSÃO: NÃO HÁ CONSENSO

IMPORTANTE: FOCAR NAS ETAPAS A SEREM CUMPRIDAS

DESCOBERTA

DESENVOLVIMENTO





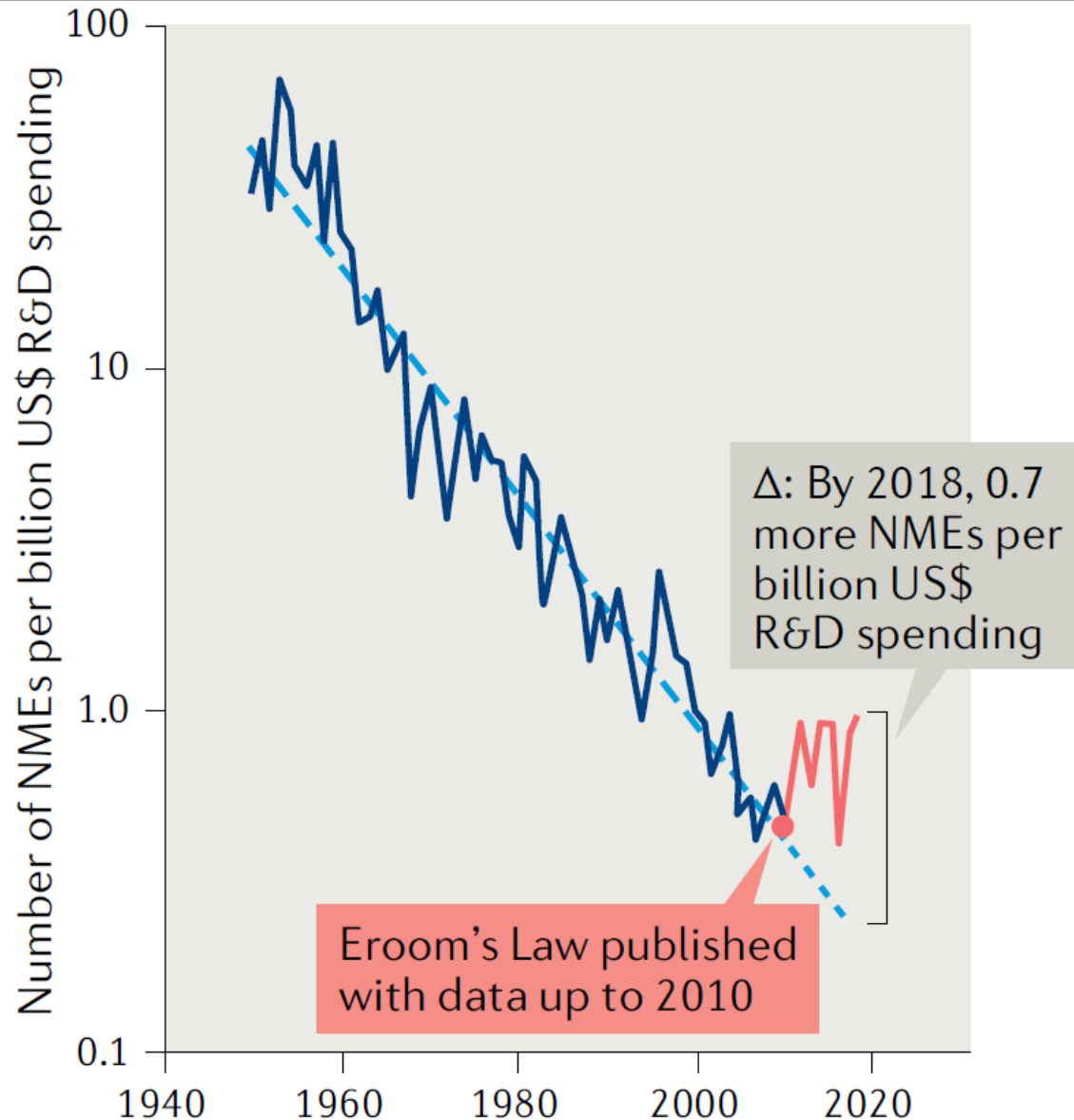
Importância da terminologia Ainda mais em atividades multidisciplinares !

Glossário Semântico de
Farmacologia

... Lateral ... ▾

- 2. Efeito adverso vs. efeito colateral
- 4; Biodisponibilidade e Absorção
- 5. Eficácia, Efetividade e Eficiência
- 10. Seletividade vs. especificidade – Fármacos multi-alvo vs. promíscuos
- 13. Hit, lead, drug candidate / Substância ativa, protótipo, candidato a fármaco
- 14. Descoberta e Desenvolvimento de fármacos
- 16. Reposicionamento de fármacos
- 17. Medicina baseada em evidências e Estudos Clínicos Controlados Randomizados
- 20. Biomarcador e desfecho substituto (“surrogate endpoint”)
- 21. Estudos pré-clínicos vs. não clínicos
- 22. Uso emergencial, acesso expandido, uso compassivo e *off label* de Medicamentos
- 23. MTD e NOAEL
- 24. Necessidade médica não atendida (*unmet medical need*)
- 25. Farmacóforo
- 26. Análise FOFA (*Swot analysis*)

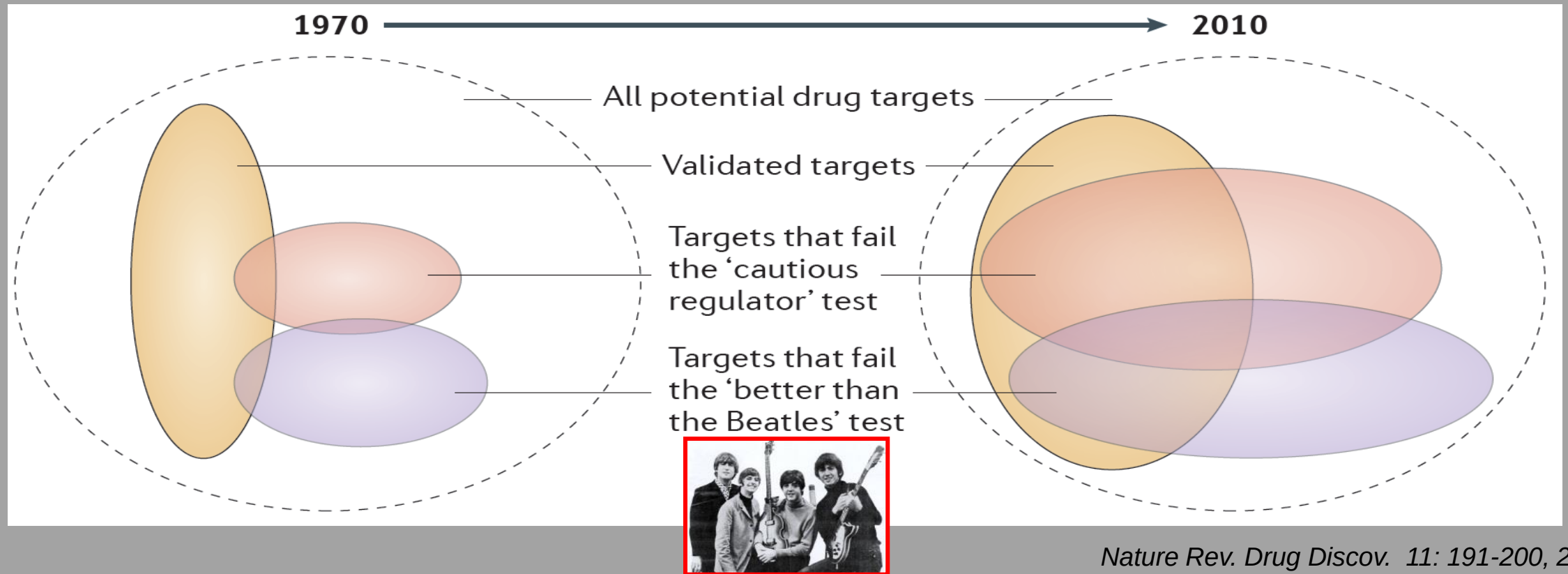
PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS:



Algo estava dando muito errado

Pelo menos até 2010

DIAGNÓSTICO DO DECLÍNIO DA EFICIÊNCIA DA R&D FARMACÊUTICA



Nature Rev. Drug Discov. 11: 191-200, 2012

SERÁ ?....outra opção pouco discutida

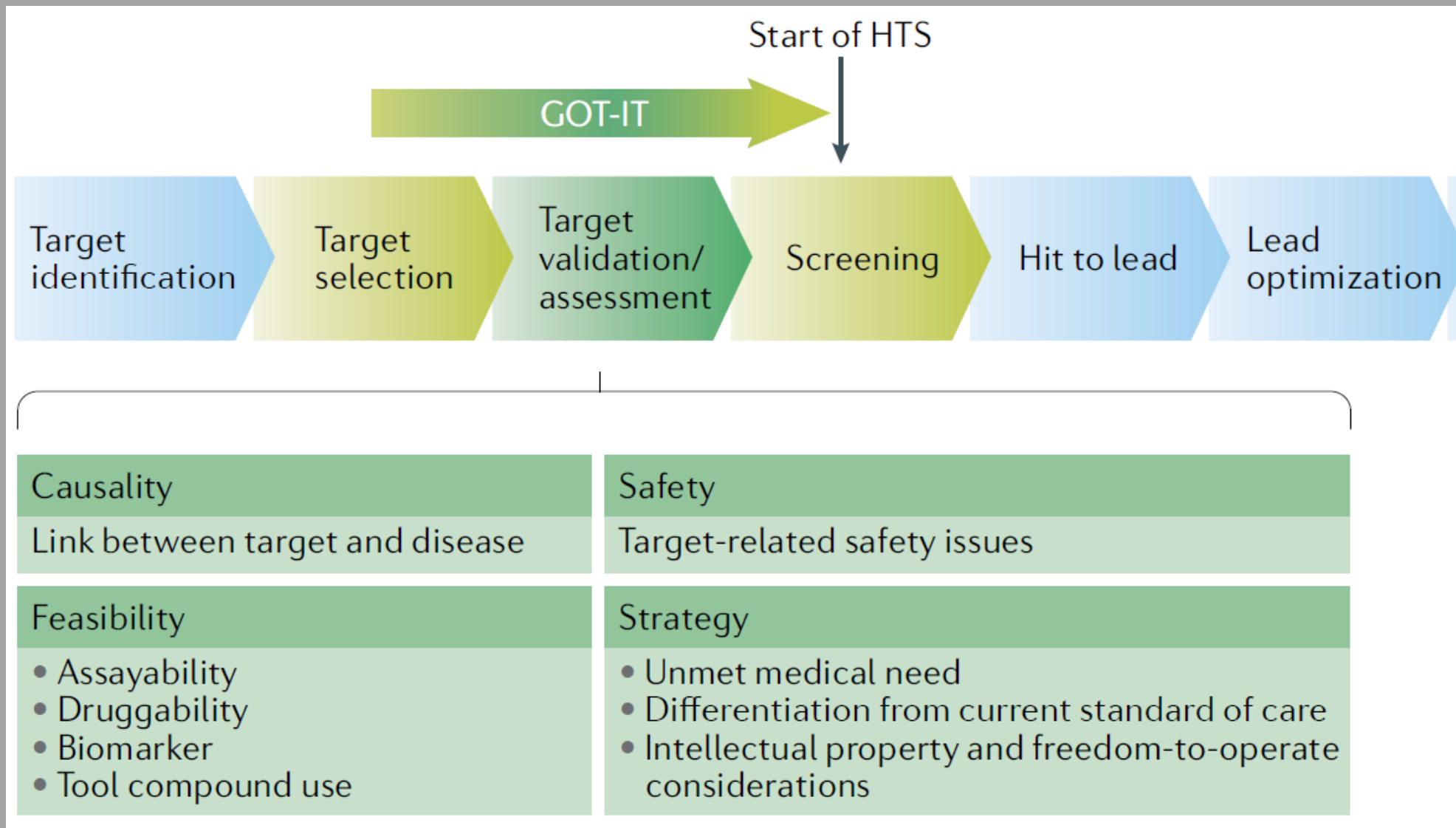
Modern biomedical research:
an internally self-consistent universe
with little contact with medical reality?

David F. Horrobin

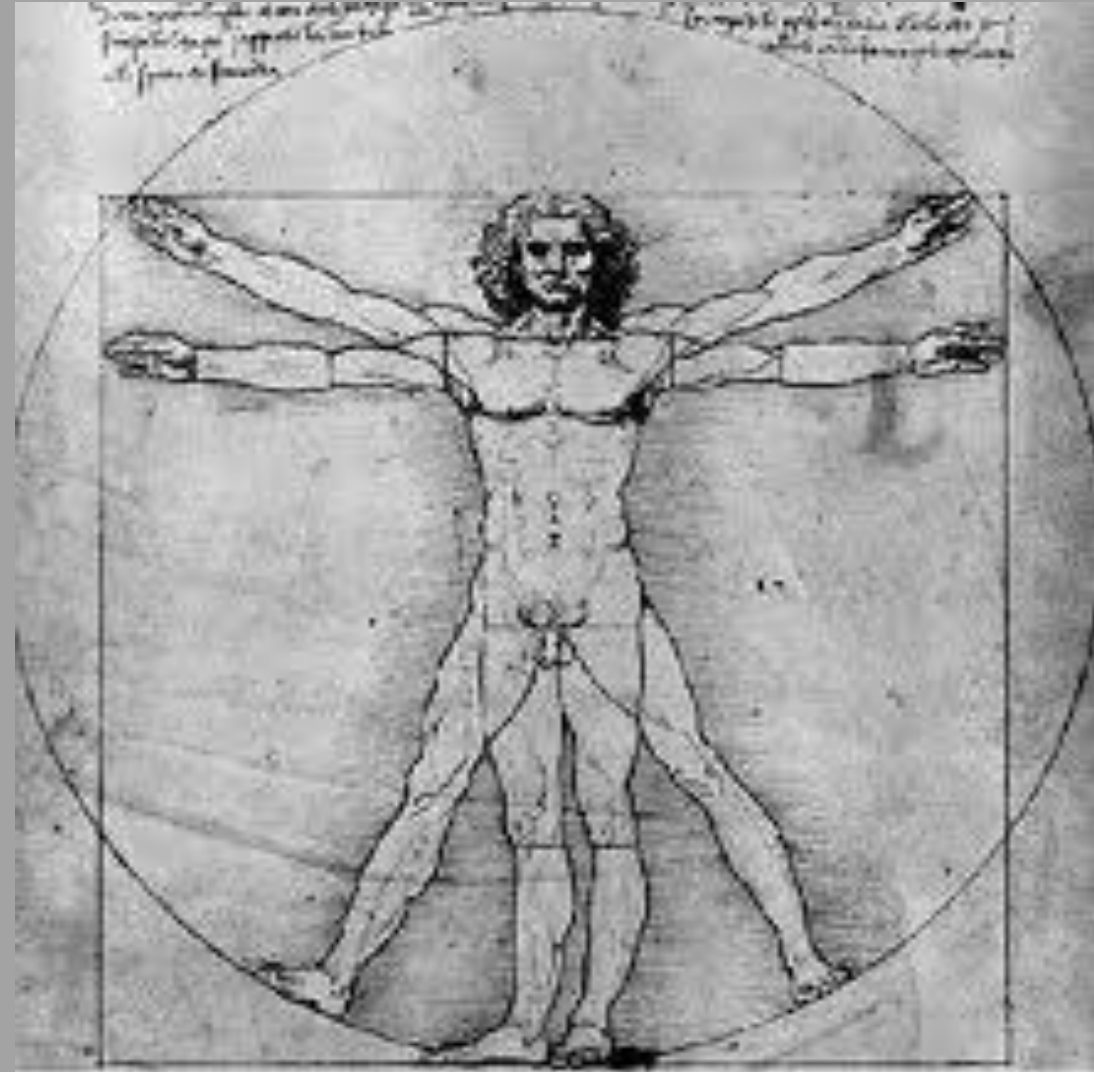
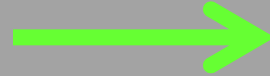
Nature Rev. Drug Discov. 2: 151, 2003

Position of the GOT-IT recommendations in the drug discovery value chain.

GOT-IT: Guidelines On **Target Assessment** for Innovative Therapeutics

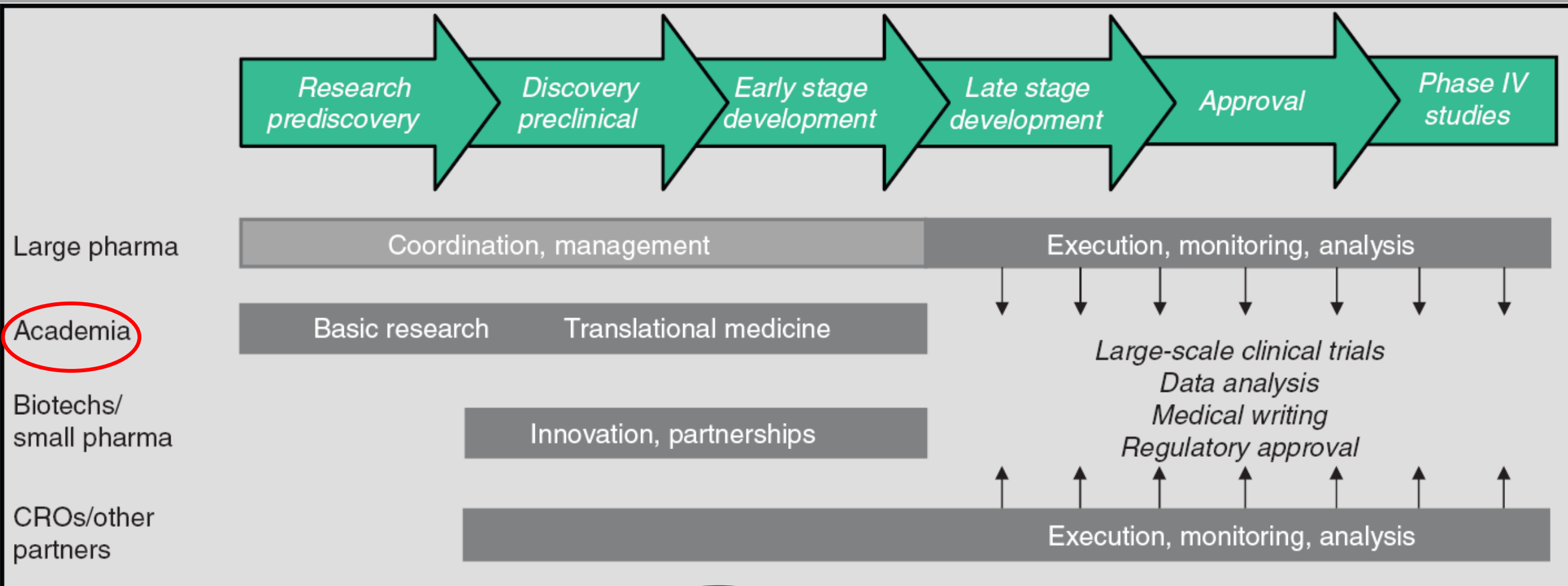


+ Problema de translacionalidade



Homem Vitruviano, 1490

How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge



Fully integrated pharmaceutical network

RESEARCH

Open Access



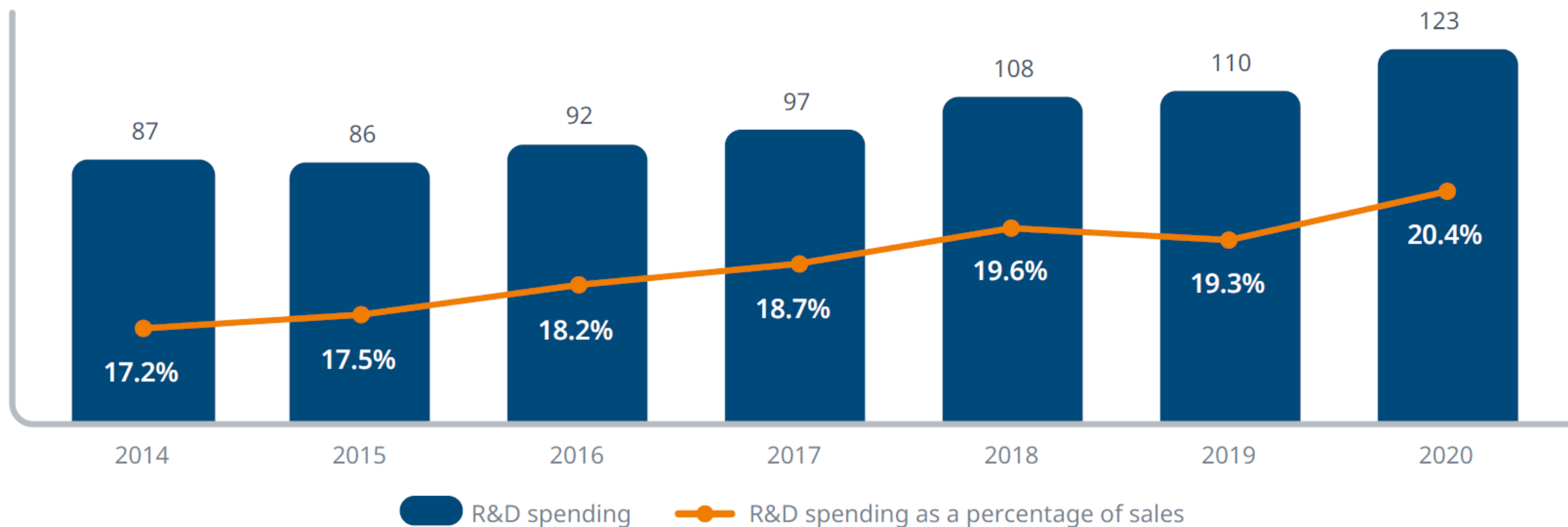
The endless frontier? The recent increase of R&D productivity in pharmaceuticals

Fabio Pammolli^{1,2*}, Lorenzo Righetto², Sergio Abrignani^{3,4}, Luca Pani^{5,6,7}, Pier Giuseppe Pelicci^{8,9} and Emanuele Rabosio²

- 1. Última década:** aumento na produtividade de DD na Indústria
- 2. Indicações:** foco em área com alto risco/alto retorno, principalmente câncer
- 3. Taxa de atrito:** diminuição em todos os estágios da pesquisa clínica
- 4. Novidade:** projetos bem sucedidos: novas indicações e mecanismos de ação

R&D expenditure by large pharma corporations totaled a record \$123 billion in 2020, and exceeded 20% of revenue for the first time

Exhibit 30: Large Pharma R&D Spending and Spending as a Percentage of Sales 2016–2020, US\$Bn



ESTRUTURA DA AULA

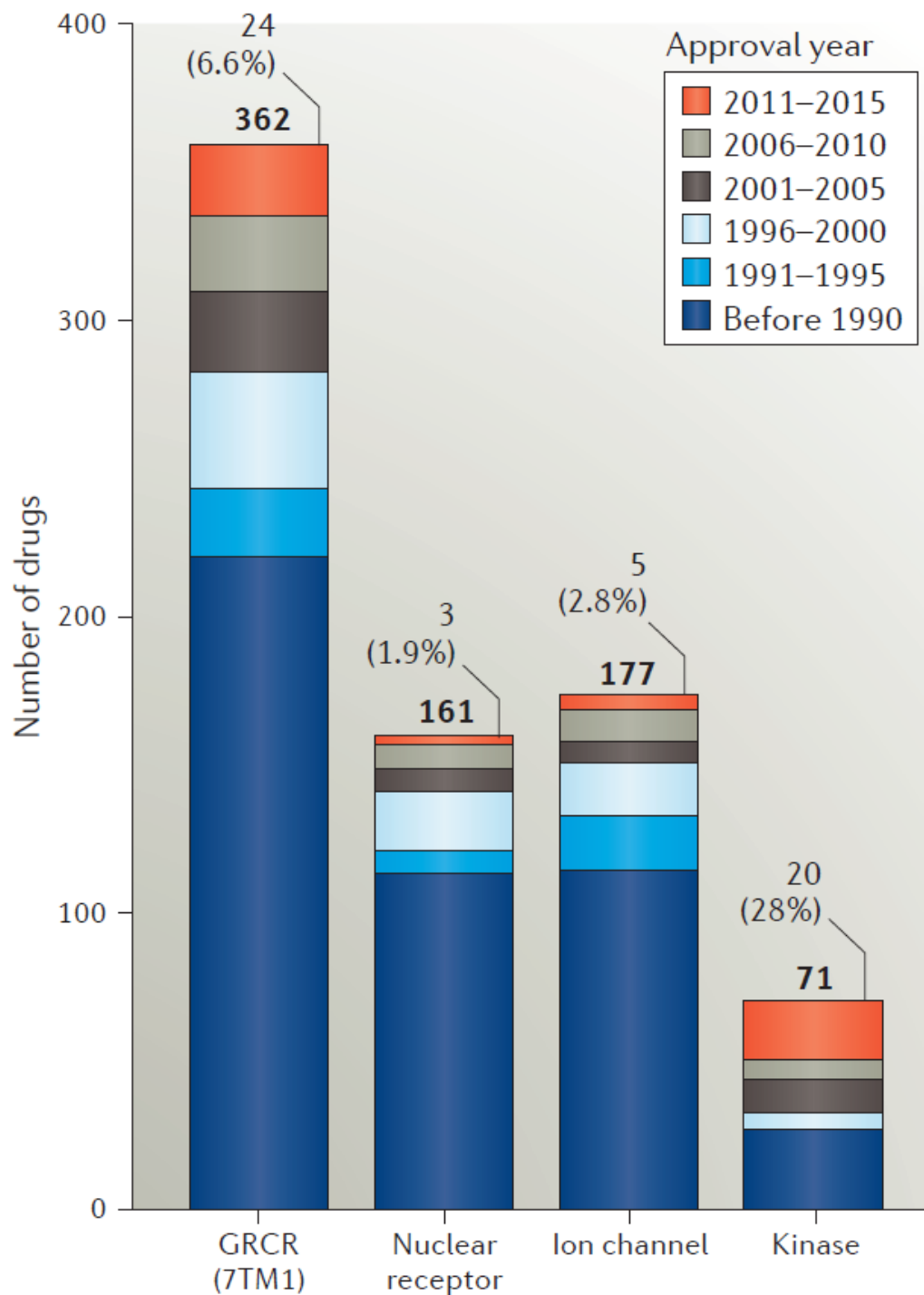
OBJETIVO: visão geral, atual e crítica do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, com ênfase nas etapas de descoberta e estudos pré-clínicos

TÓPICOS:

- DD&D: introdução e desafios
 - Estratégias para planejamento sintético
 - Tipos de ensaios farmacológicos
-
- Ensaio a serem realizados (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*), com fluxograma



Abordagem quantitativa com discussão sobre os valores “desejados”



Descoberta de novos fármacos:

Estrategias:

I. Escolha do alvo molecular

4 families of privileged target proteins

Small molecules + Biologics

Descoberta de novos fármacos:

Estratégias:

II. Nível de inovação

- “*Me too*”: nova molécula ↔ avanço terapêutico
- **Pesquisa inovadora**
 - RADICAL (“*first-in-class*”): ↑ eficácia (ex: *statinas*)
 - INCREMENTAL: ↑ eficiência (ex: *amlodipina*)

*“Le véritable voyage de découverte ne
consiste pas à chercher de nouveaux
paysages, mais à voir avec de nouveaux
yeux”*

(A la recherche du temps perdu - 1918)

**A verdadeira viagem de descoberta não
consiste em procurar novas paisagens
mas em ver com novos olhos**



Marcel Proust
(1871-1922)

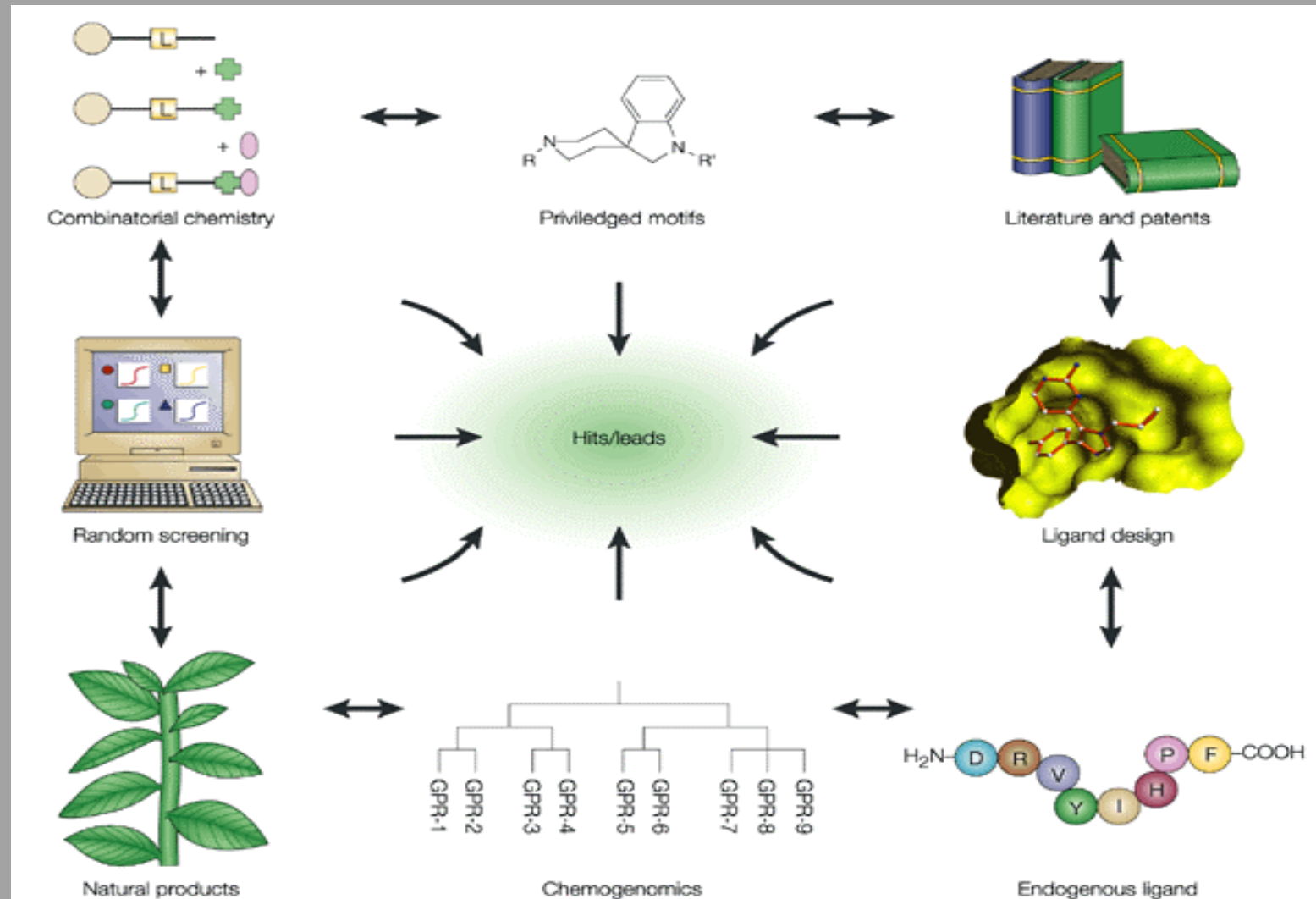
e dar asas à imaginação



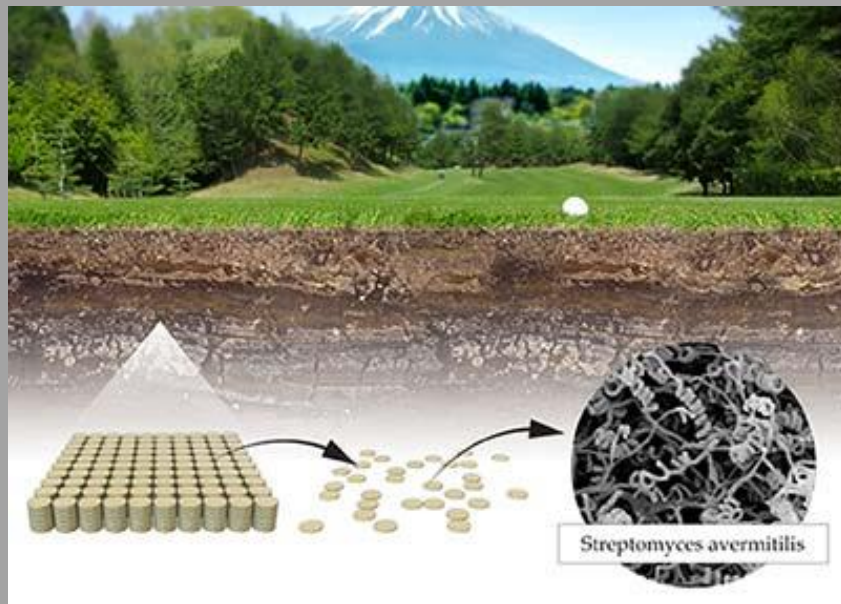
René Magritte
(A grande família, 1963)

Descoberta de novos fármacos:

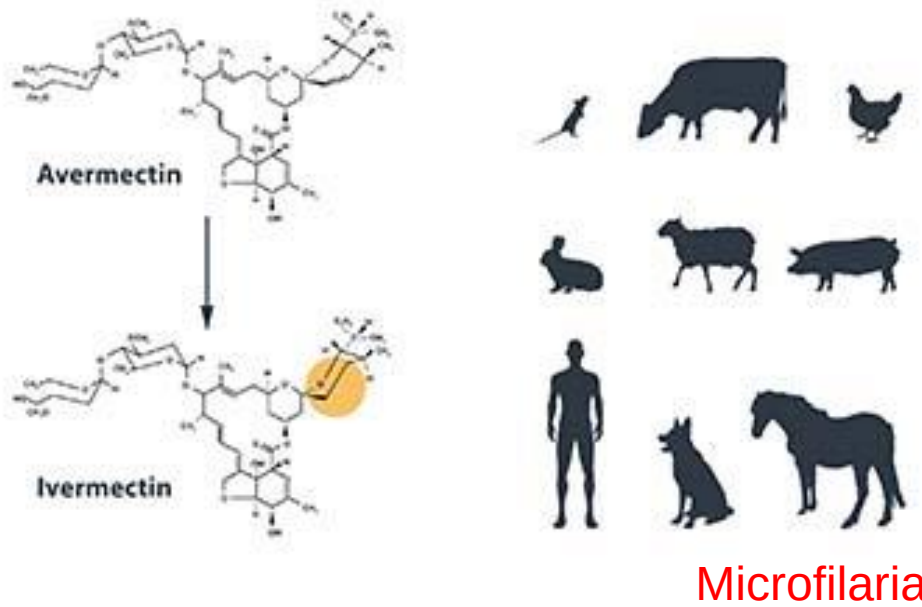
Estrategias: *III. fonte de nova molécula ativa*



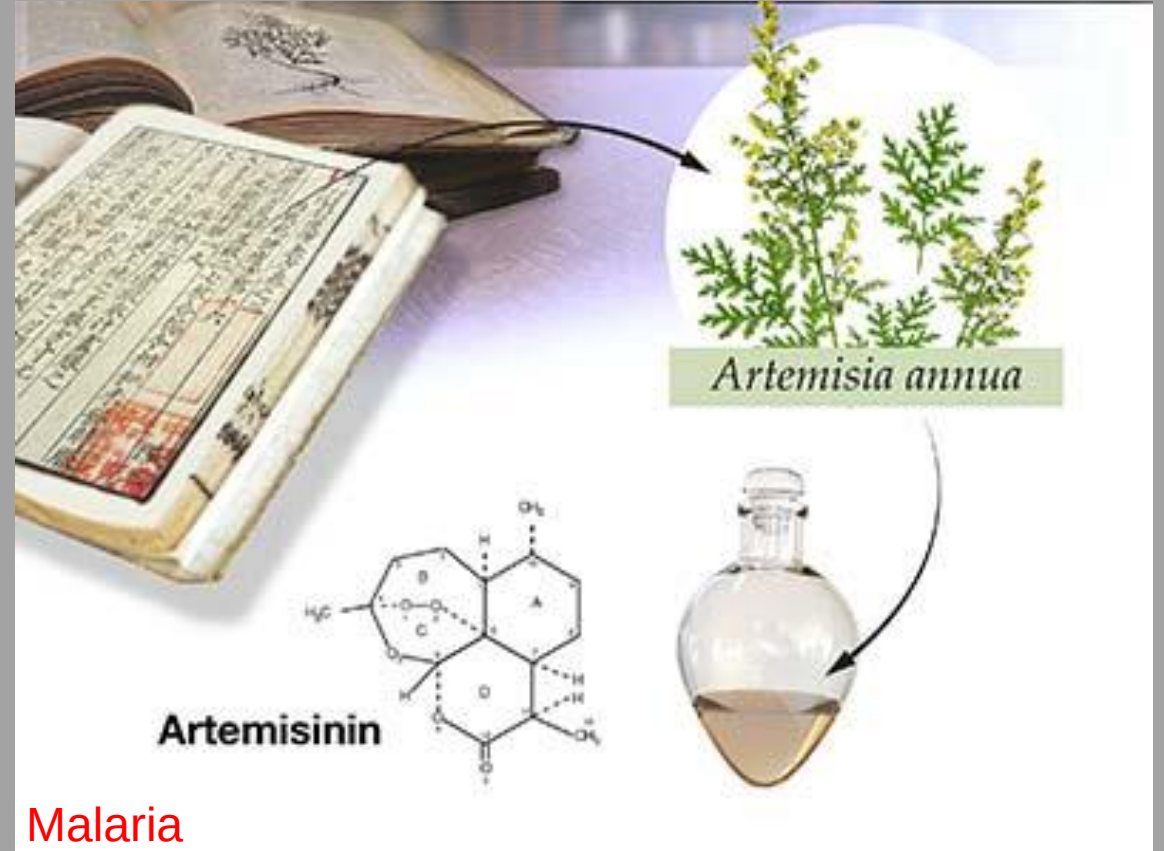
PRÊMIO NOBEL (2015): Ivermectina e Artemisinina



Satoshi Ōmura: *S. avermitilis*



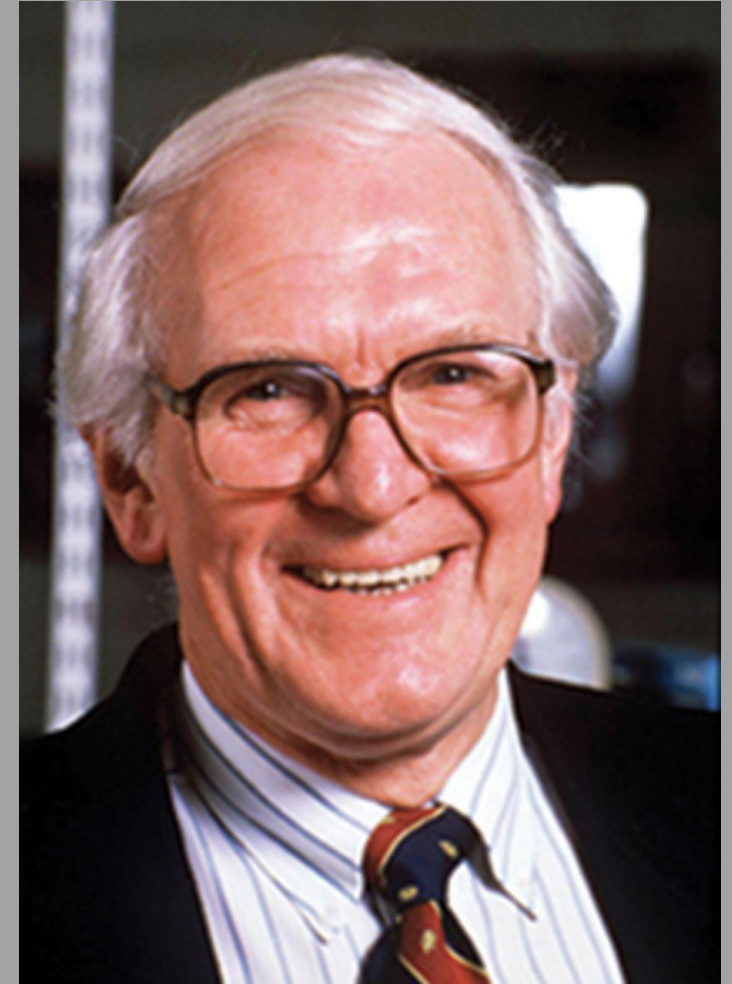
William C. Campbell: Ivermectina



Youyou Tu: Artemisinin

“The most fruitful basis of the discovery of a new drug is to start with an old drug”

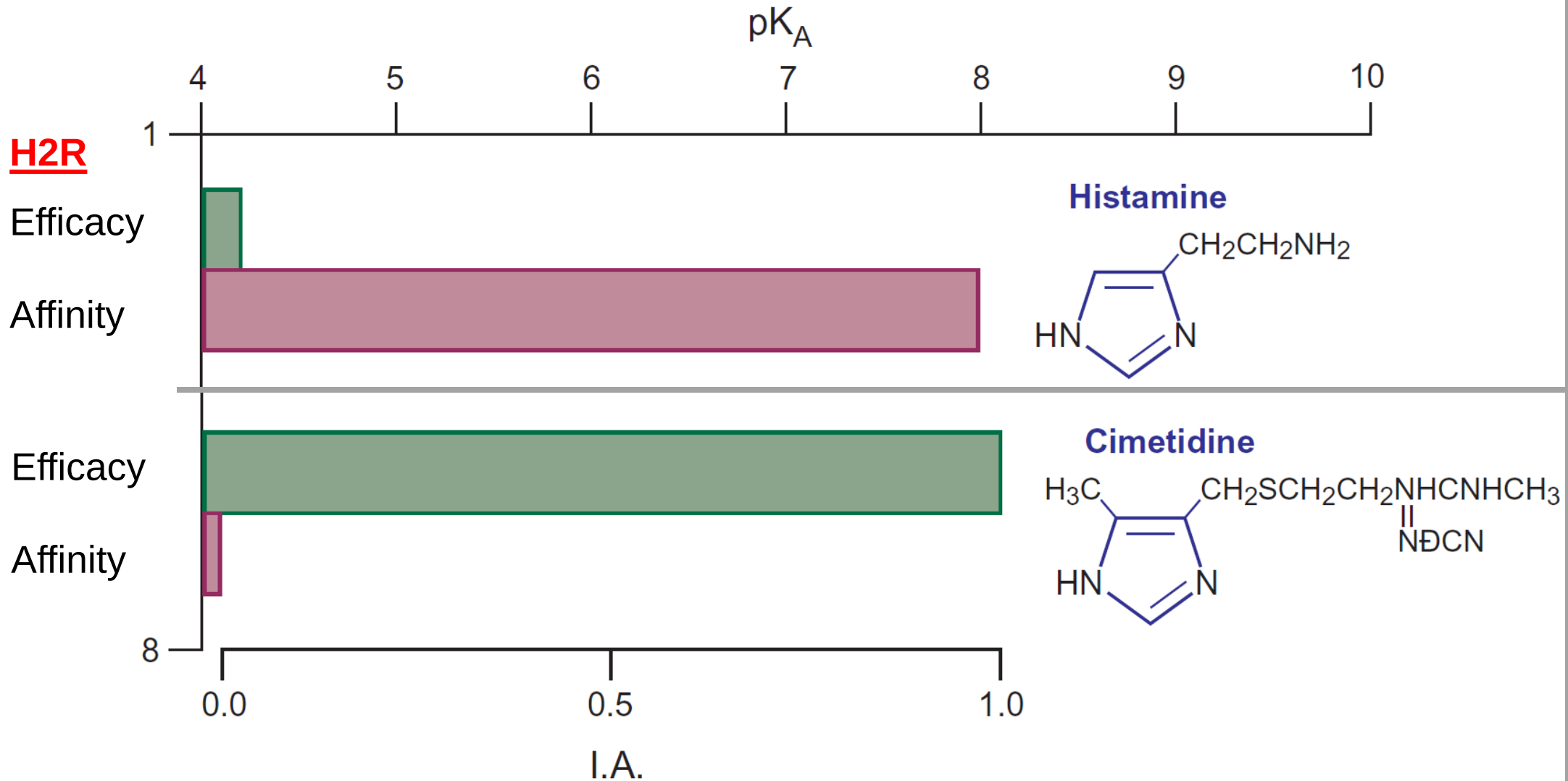
A base mais frutífera para descoberta de um novo fármaco é começar com um antigo



Sir James Blake
(1924-2010)

... we knew the receptor bound histamine, so it was
a matter of keeping affinity and losing efficacy...

— Sir James Black (1996)



REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

<https://www.sbfte.org.br> (glossário semântico de farmacologia)

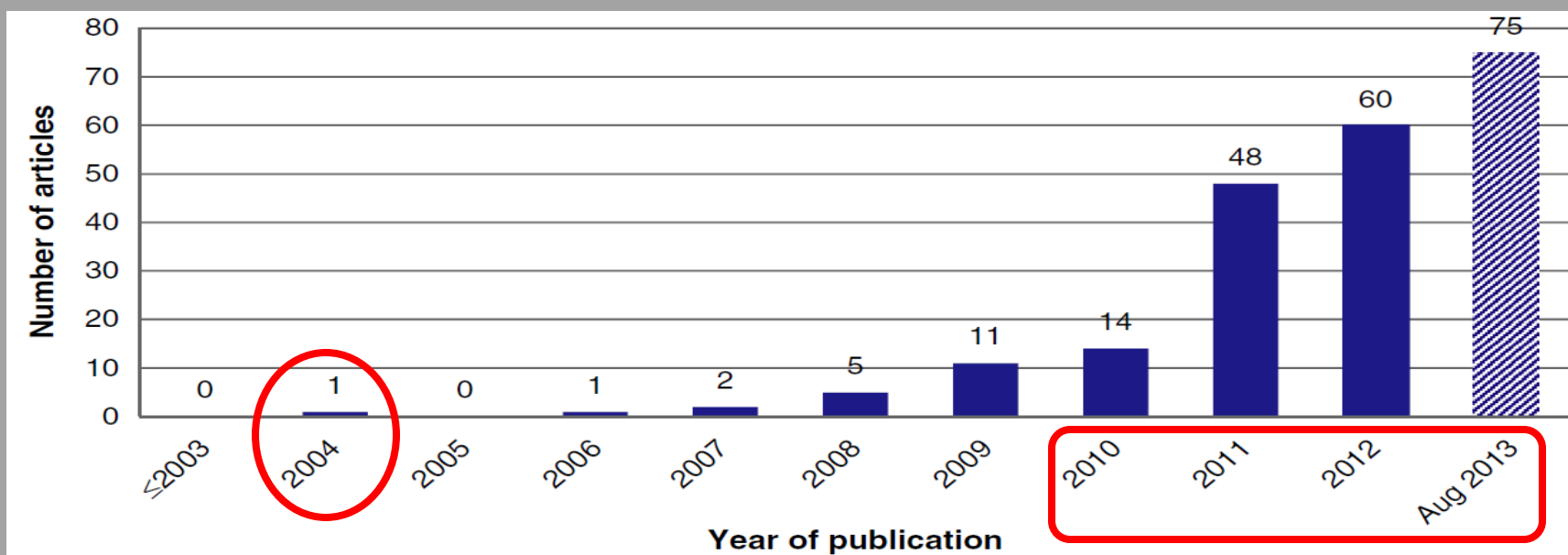
“Estratégia que busca descobrir novas aplicações para um **fármaco existente**, que não foram previamente referenciadas e que atualmente não são prescritas ou investigadas”

IUPAC (Buckle e cols., Pure Appl. Chem. 85,(8): 1725–1758, 2013)

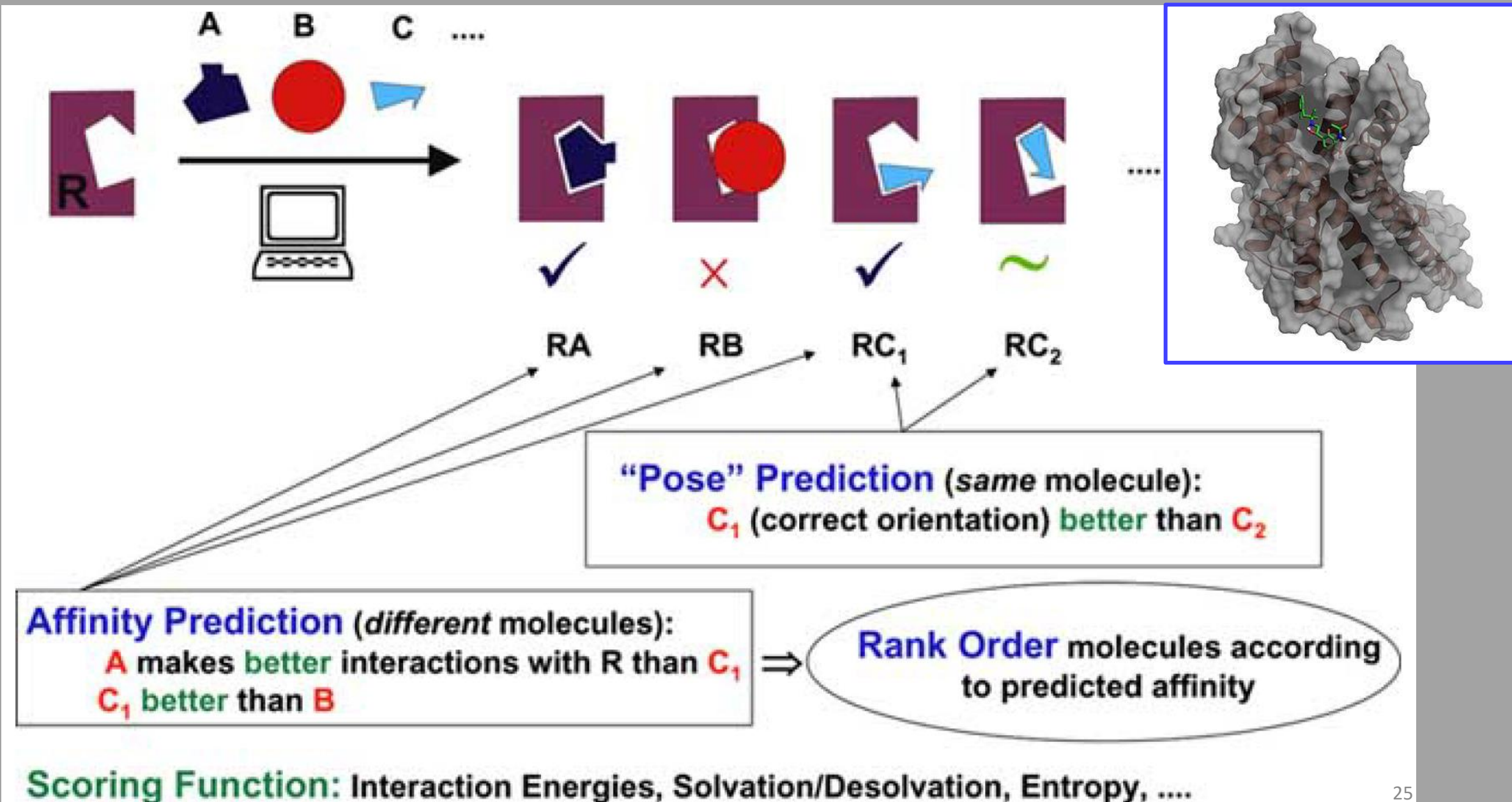


Nature 534:314-316, 2016

Assunto relativamente novo



Structure-based drug design: DOCKING (+ *molecular dynamics*)



Docking: cristalografia ou modelo por homologia ?

Experimental Structures

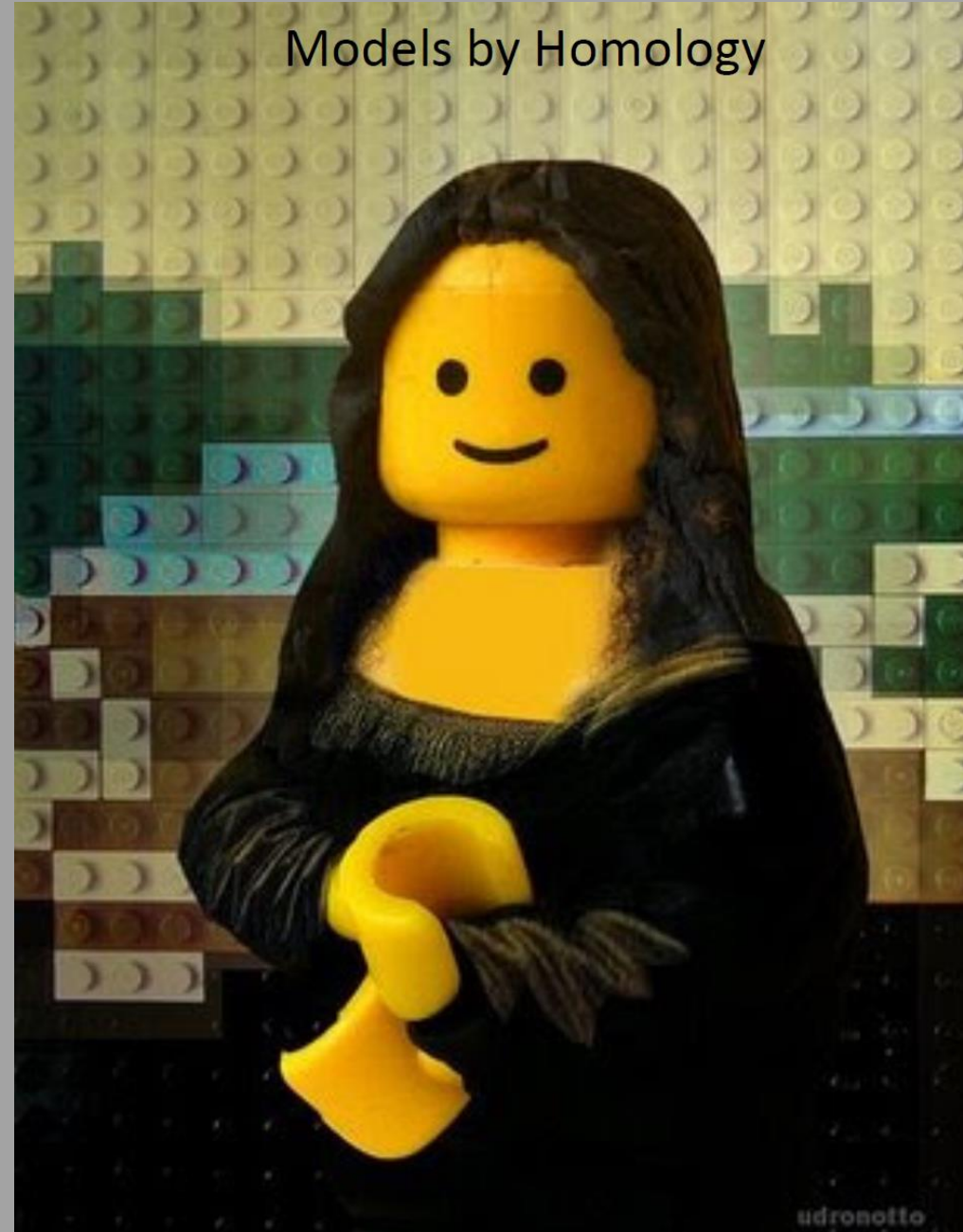


Docking: cristalografia ou modelo por homologia ?

Experimental Structures



Models by Homology



Descoberta de novos fármacos:

Estrategias:

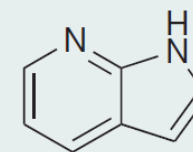
IV. Ponto de partida da síntese química

- “**Tradicional**”: busca de pequenas entidades moleculares com características físicoquímicas de fármacos
- Química combinatória
- “*Fragment-based Drug Discovery*”

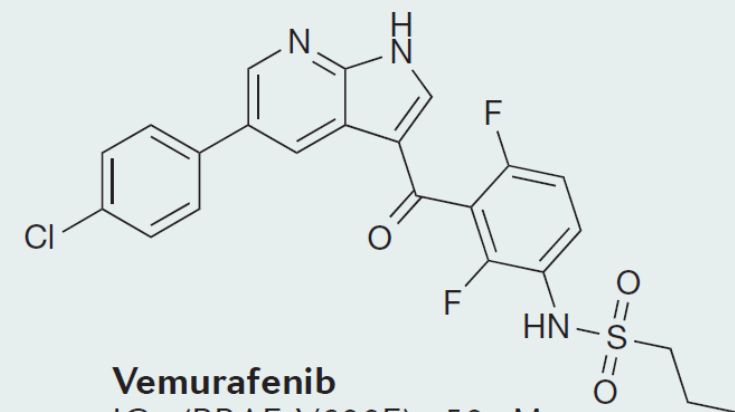
Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery

Daniel A. Erlanson¹, Stephen W. Fesik², Roderick E. Hubbard^{3,4}, Wolfgang Jahnke⁵ and Harren Jhoti⁶

Fragment-based drug discovery (FBDD) takes a different approach. Rather than screening millions of compounds to find drug-sized starting points, FBDD begins with much smaller collections of smaller compounds. Fragments are usually defined as having less than 20 non-hydrogen (or 'heavy') atoms. In contrast to



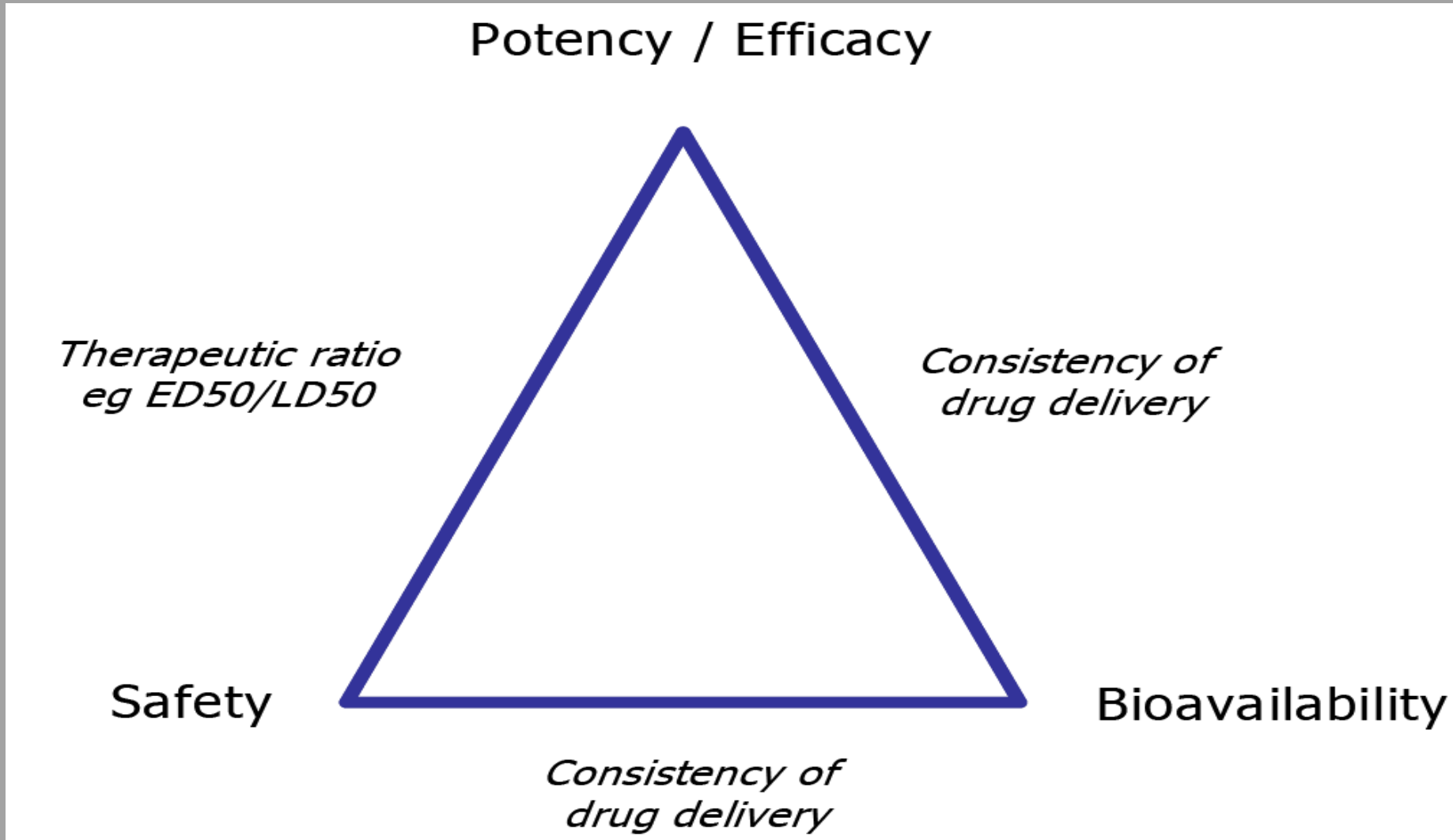
Lead fragment
 IC_{50} (PIM1) >200 μ M



Vemurafenib
 IC_{50} (BRAF-V600E) = 50 nM

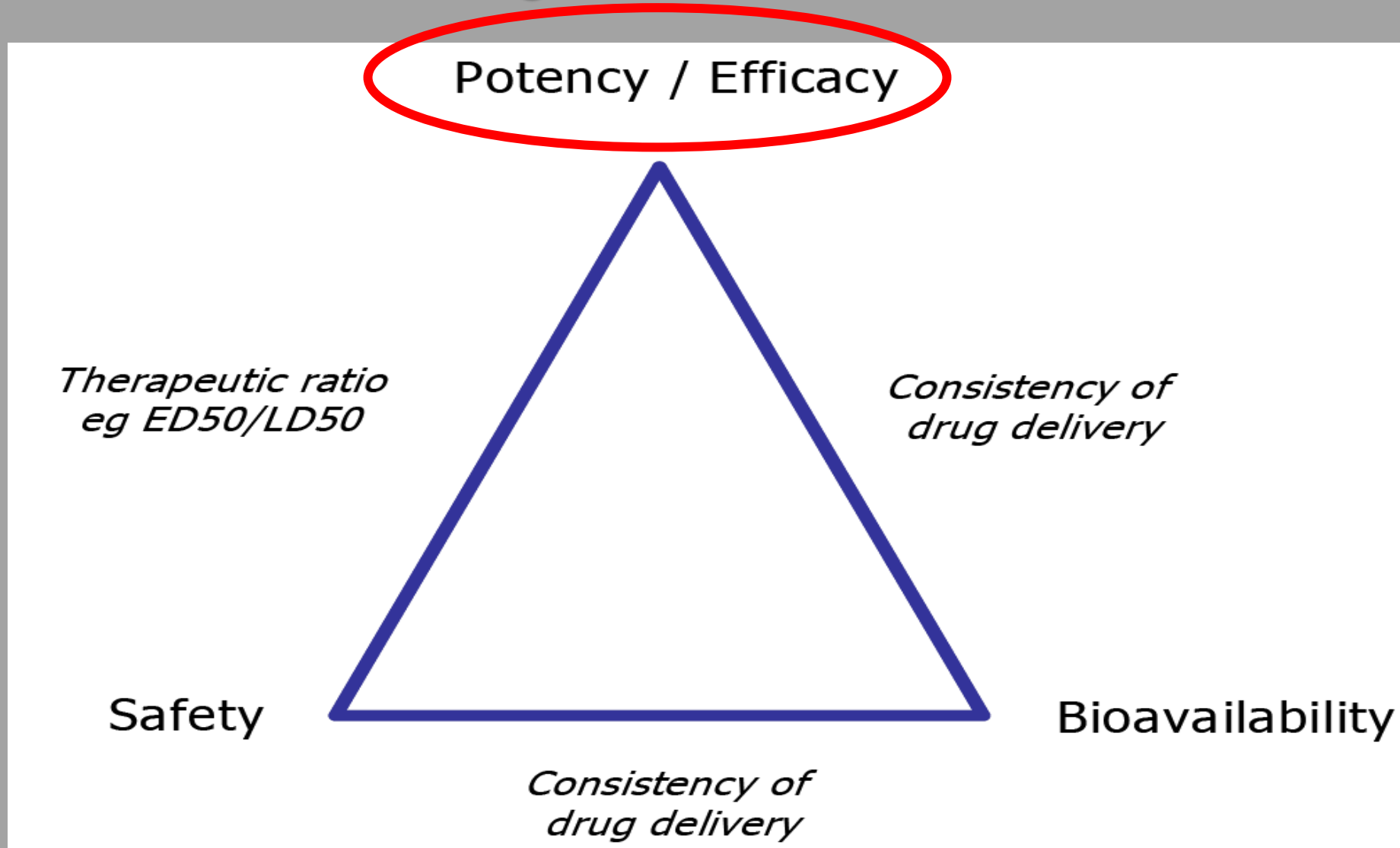
29

Descoberta de fármacos: o *Triângulo das Bermudas*



Descoberta de fármacos:

o Triângulo das Bermudas



ESTRUTURA DA AULA

OBJETIVO: visão geral, atual e crítica do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, com ênfase nas etapas de descoberta e estudos pré-clínicos

TÓPICOS:

- DD&D: introdução e desafios
 - Estratégias para planejamento sintético
 - **Tipos de ensaios farmacológicos**
-

- Ensaios a serem realizados (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*), com fluxograma



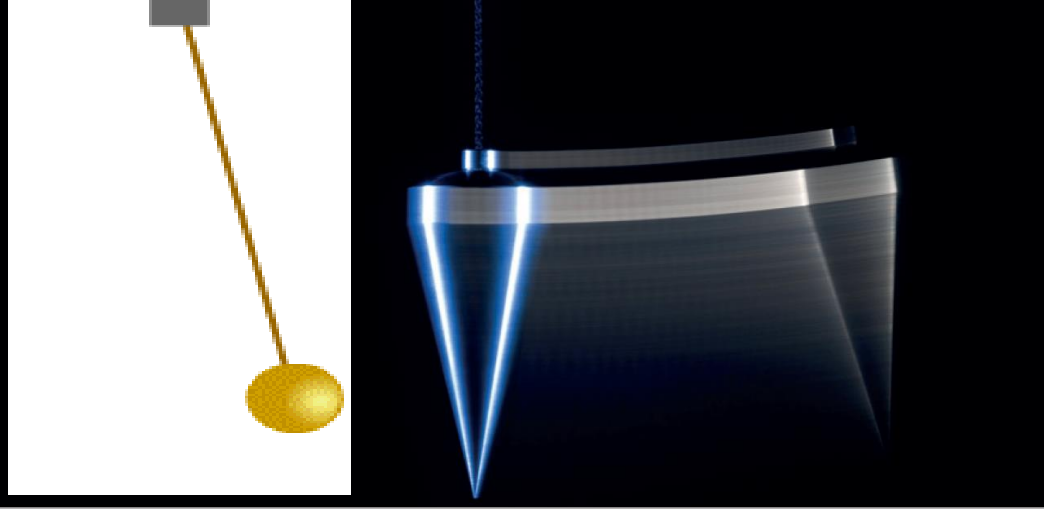
Abordagem quantitativa com discussão sobre os valores “desejados”

Descoberta de novos fármacos:

Estrategias:

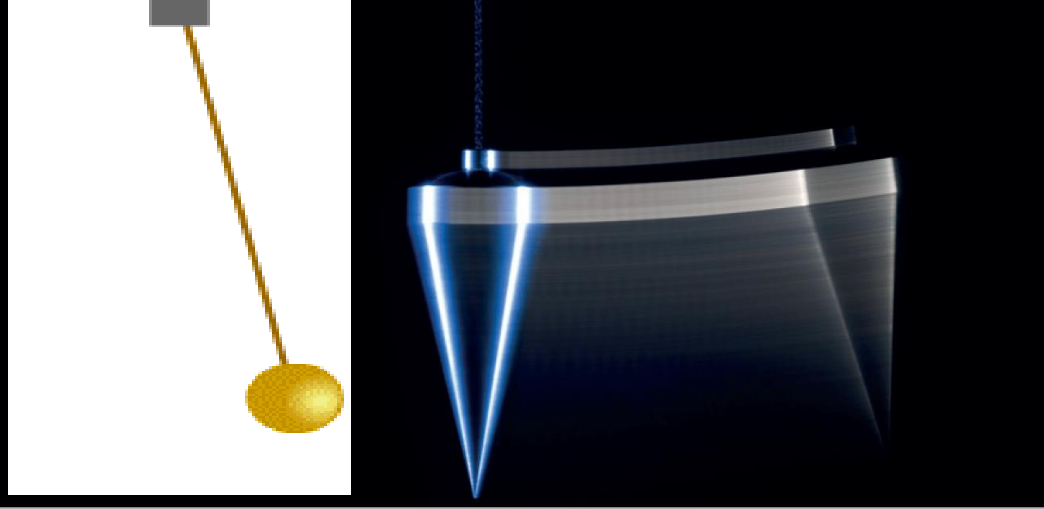
V. tipo de ensaio farmacológico

- Alvo dirigido (*“Target-based drug discovery”*)
- Fenotípico (*“testing of a large number (in most cases randomly selected) compounds in a systems-based approach using a target-agnostic assay that monitors phenotypic changes”*)



The phenotypic screening pendulum swings

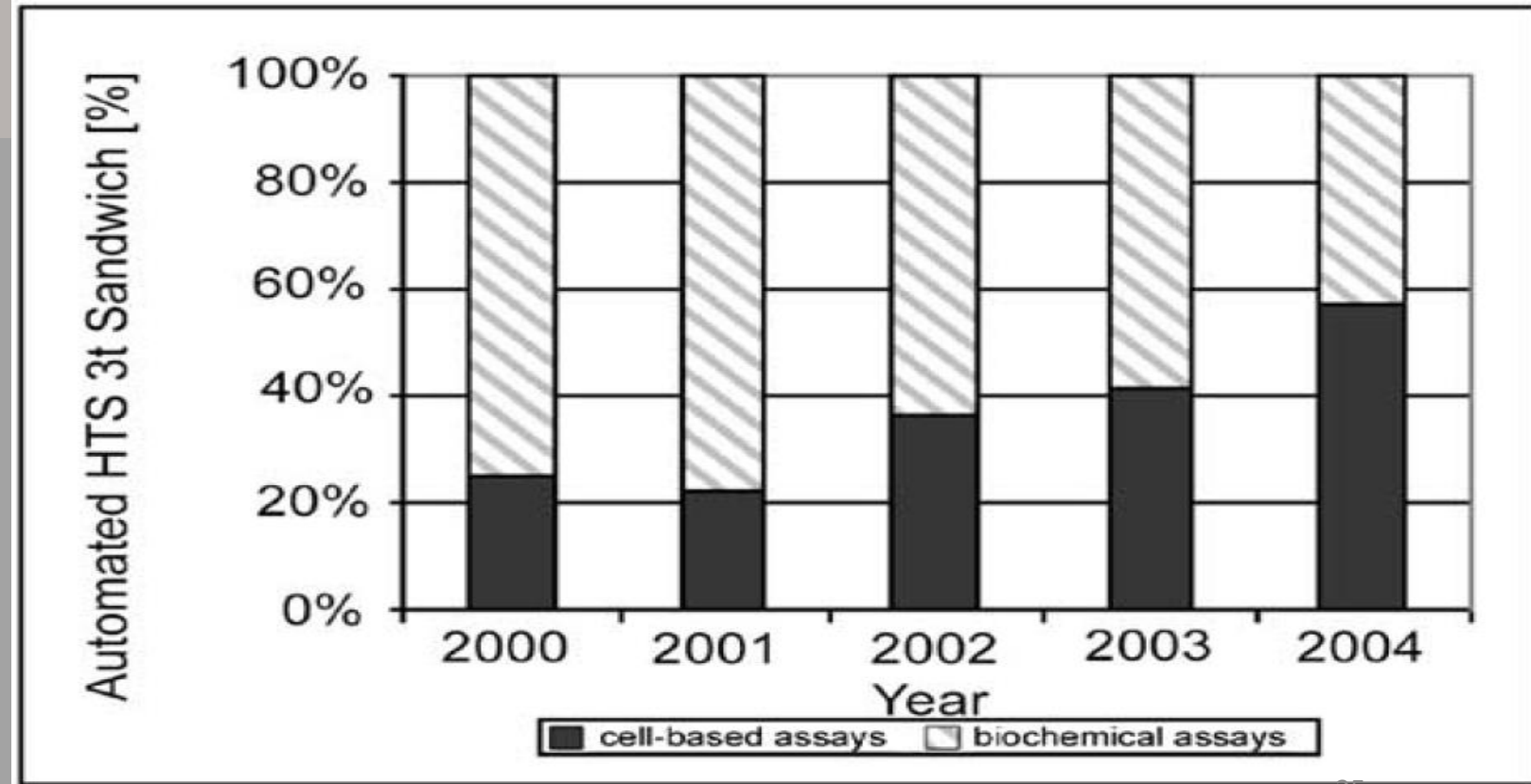
Nature Rev. Drug Discov. 14: 807, 2015



The phenotypic screening pendulum swings

Nature Rev. Drug Discov. 14: 807, 2015

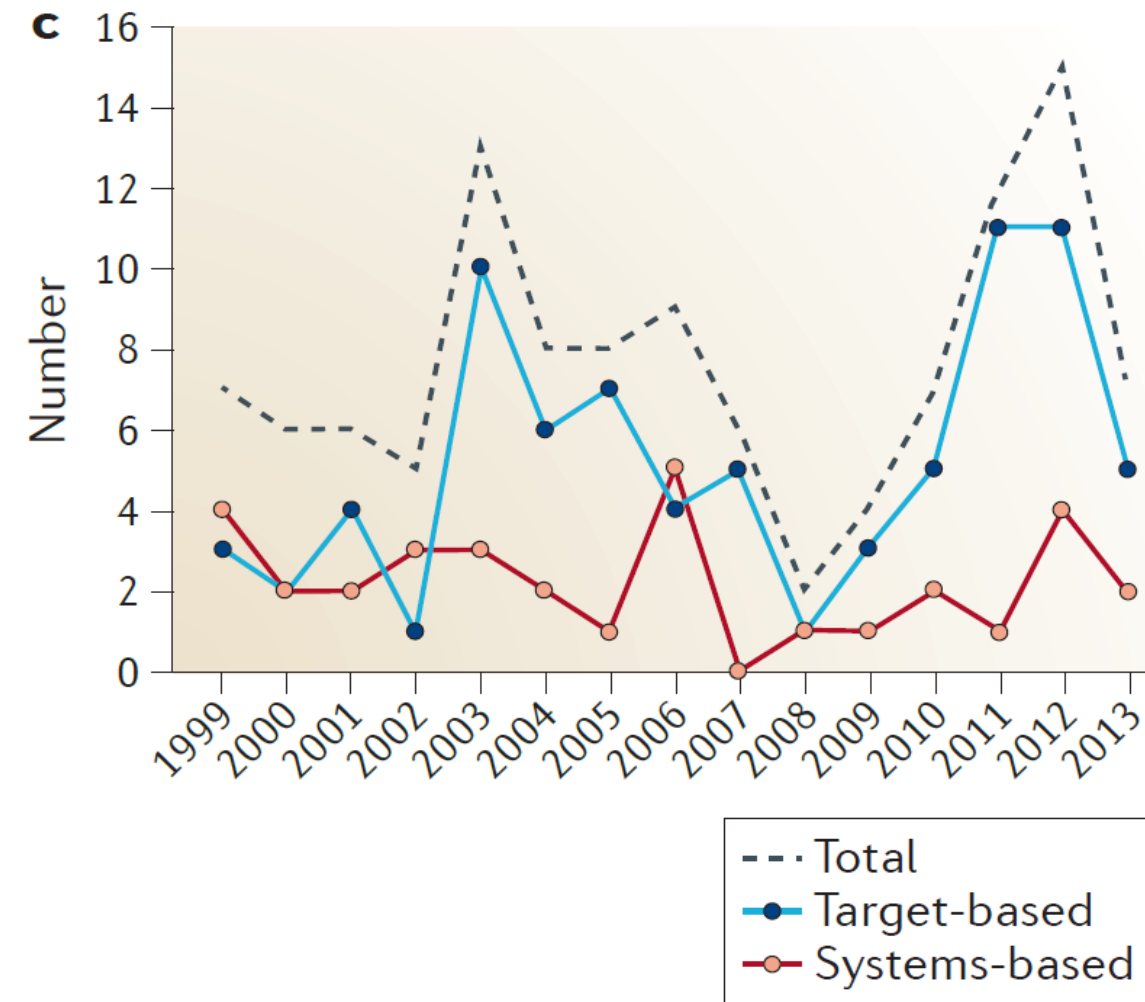
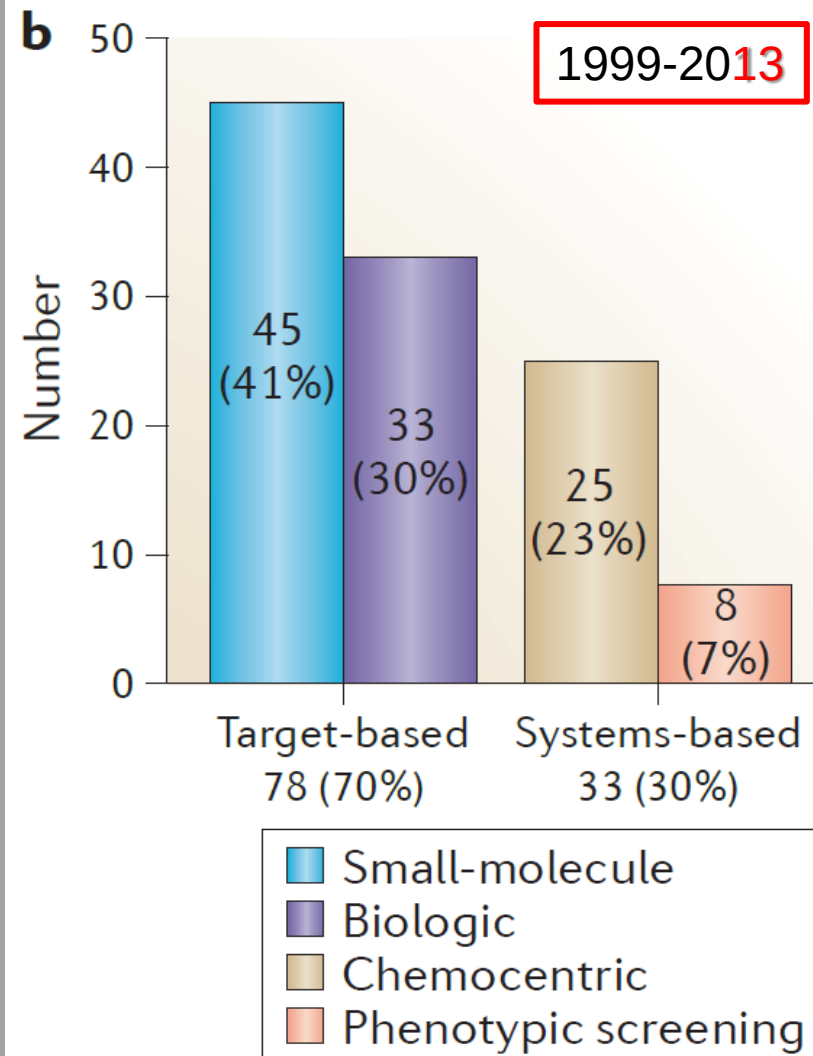
Na Pfizer, a mudança começou em 2002



The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY
VOLUME 13 | AUGUST 2014 | 577

Jörg Eder, Richard Sedrani and Christian Wiesmann



SPECIAL LEAD ARTICLE

Reflections on drug research

James Black

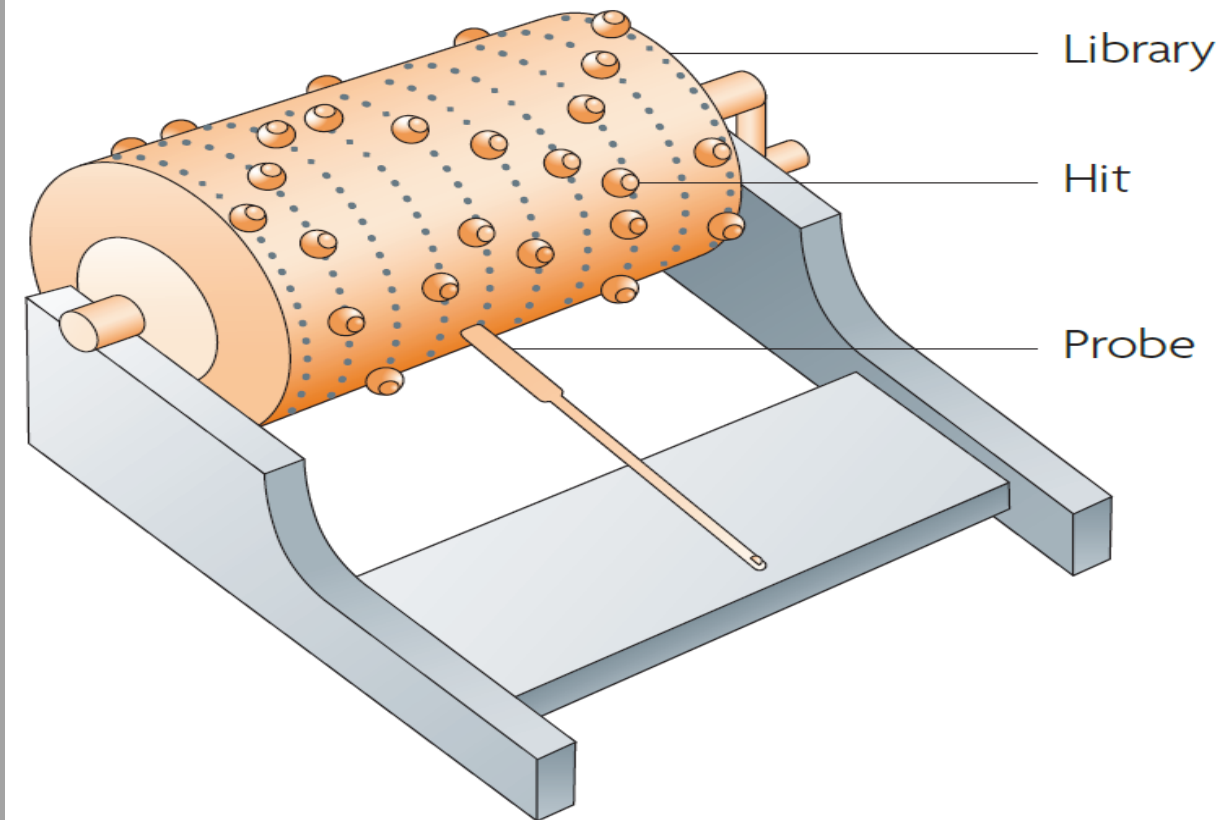


*“Nenhum nível de avaliação é mais informativo do que o outro;
por isso, acredito fortemente que a farmacologia precisa ser
estudado em todos os níveis, sendo que a escolha do nível deve
ser ditada pela natureza da questão que é feita”*

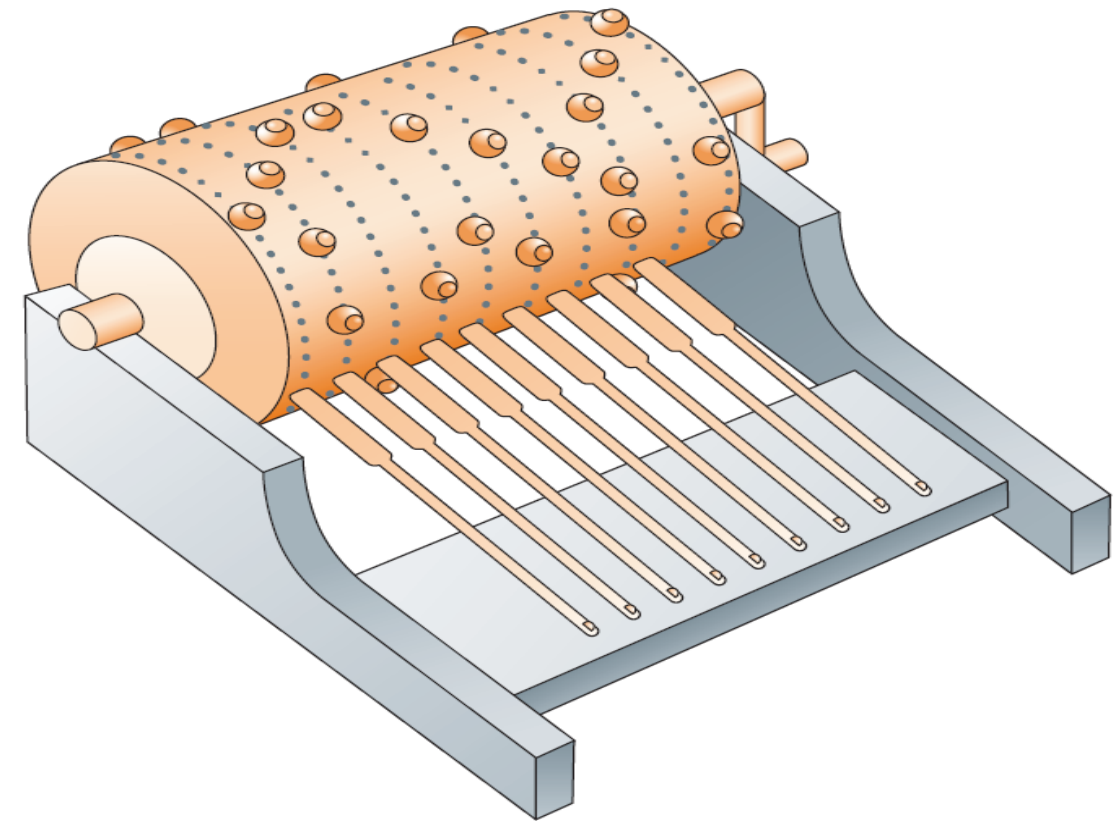
ENSAIO ALVO-DIRIGIDO vs. FENOTÍPICO

Analogia da “Caixinha de música”

Single probe screening
(for example, radioligand binding)



Multiple probe screening
(for example, a label-free assay)



TIPOS DE ENSAIO PARA SCREENING *in vitro*

A. Ensaio bioquímico baseado no ALVO (inibição enzimática, *Binding*)

Racional:

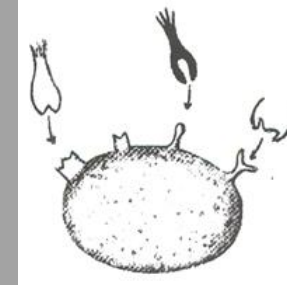
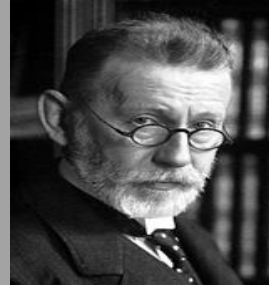
“Corpora non agunt nisi fixata”

Vantagens:

- Dados mais “reprodutíveis” e precisos + robotização (HTS)
- Não é limitado por problemas de potência e permeabilidade
- Pode ser feito em concentrações relativamente altas

Desvantagens:

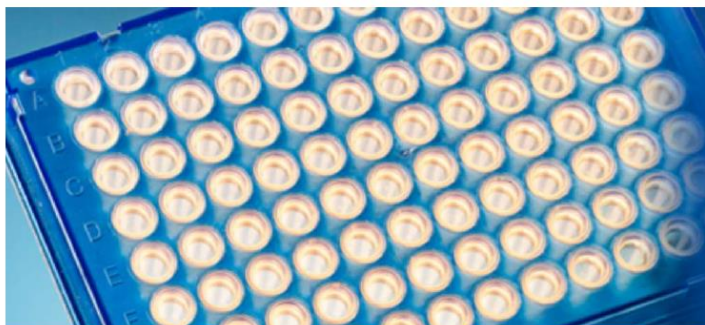
- Visão reducionista: produz fármacos para **alvos** (translacionalidade?)
- Limitado pelo fato de medir *somente* a afinidade (**Exceções!**)



Paul Ehrlich
(1854-1915)

GPCR Radioligand Binding Services

[Services](#) >> [In Vitro Assays](#) >> [GPCRs](#) >> Binding



Determine intrinsic activity and affinity of a drug to a target receptor's binding domain using Radioligand assays.

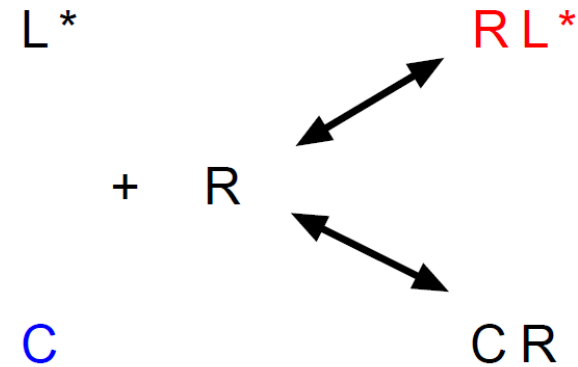
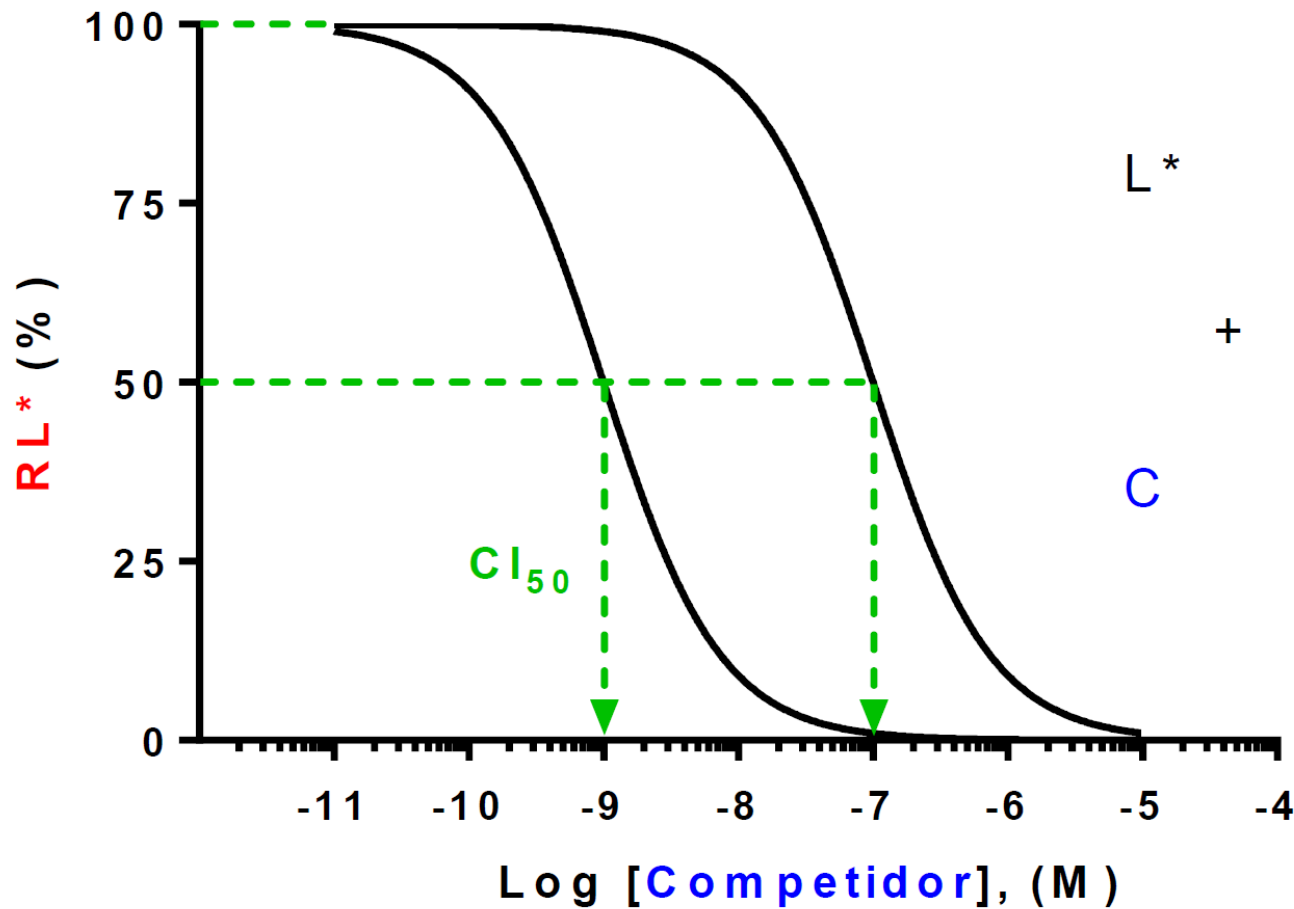


Contact Us
Let us know your needs

Radioligand binding is the gold standard method for detecting compound interaction with GPCRs, allowing for the simplest interpretation of assay results. A favorite of medicinal chemists, radioligand displacement assays can be used for a simple yes/no interaction determination or to calculate a compound's affinity for a receptor of interest. Combined with [GPCR functional assays](#), binding studies can provide a complete profile of a compound's *in vitro* pharmacology.

Screening: Binding para determinação de afinidade

ENSAIO DE COMPETIÇÃO (*no equilíbrio*)



Cheng-Prusoff

$$CI_{50} = K_i \cdot (1 + [L^*] / K_d)$$

FÁRMACO SELETIVO vs MULTI-ALVO

Magic bullet



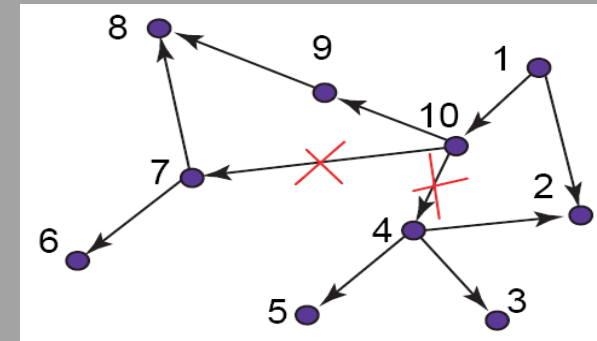
X

Magic shotguns versus magic bullets:
selectively non-selective drugs for
mood disorders and schizophrenia

Bryan L. Roth, Douglas J. Sheffler and Wesley K. Kroeze

Nature Drug Discov. 3: 352-359, 2004

visão holística:
redes e circuitos neurais



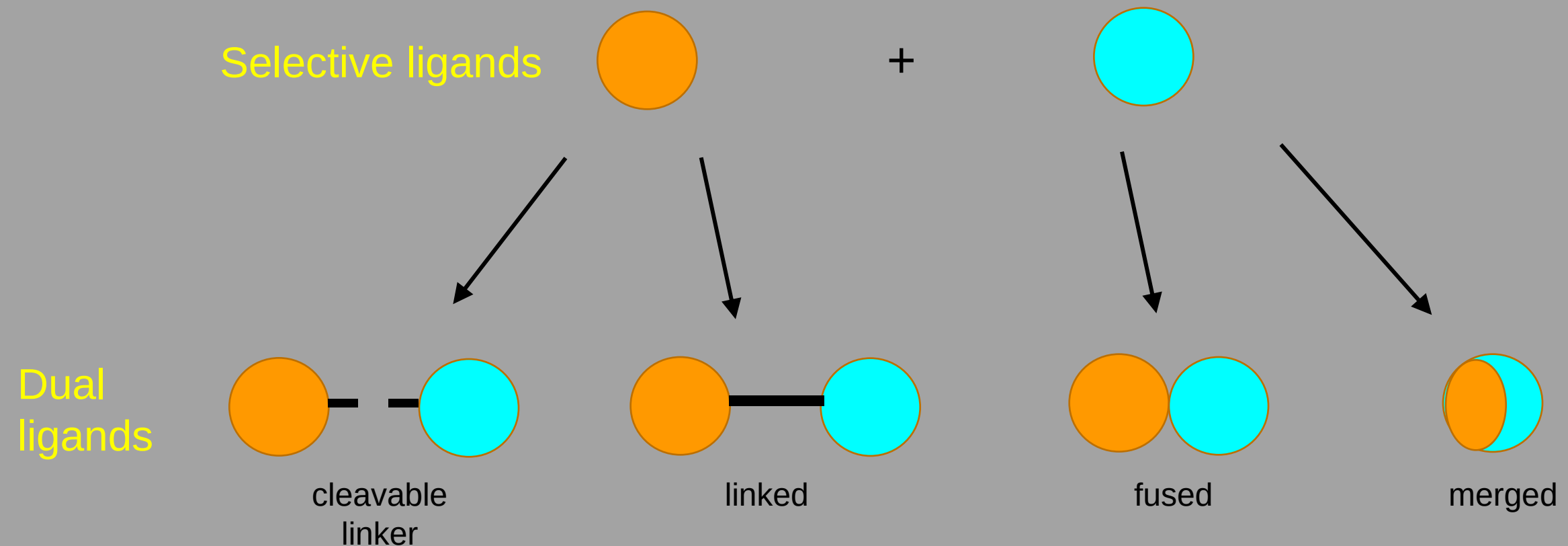
**The efficiency of multi-target
drugs: the network approach
might help drug design**

Péter Csermely¹, Vilmos Ágoston² and Sándor Pongor^{2,3}

TIPS 26: 178-182, 2005

Can we rationally design promiscuous drugs?

Andrew L Hopkins¹, Jonathan S Mason¹ and John P Overington²



TIPOS DE ENSAIO PARA SCREENING *in vitro*

B. Ensaio FENOTÍPICO

Pode ser mais eficiente por ser capaz de avaliar a eficácia já que a *função* de receptor pode ser medida, o que não ocorreria com o *binding* (!! Exceções).

1. Tradicionais: órgãos isolados

- Limitação: Tempo, quantidade de substância, ética (animais....)

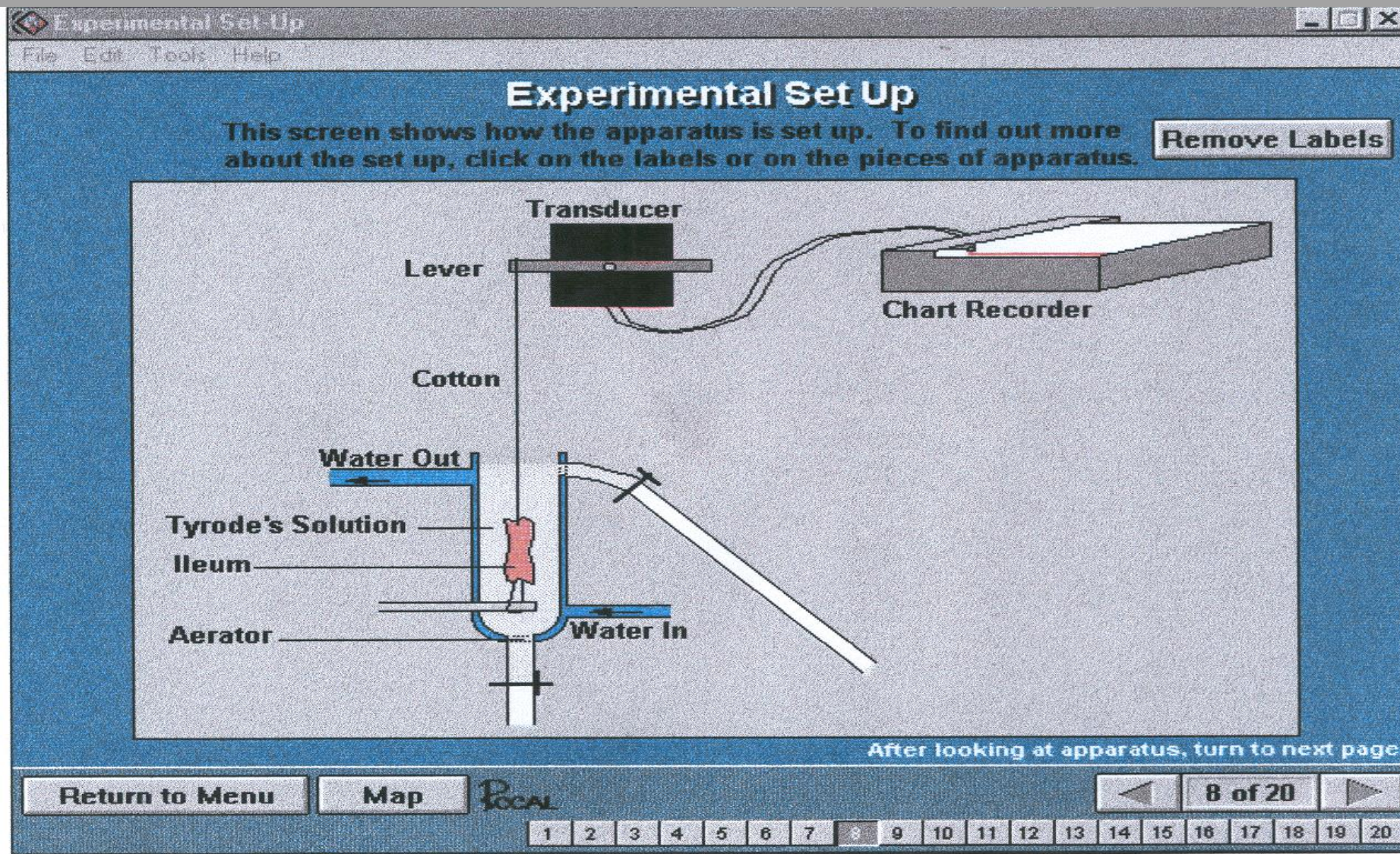
2. Baseados em células

- Vantagem: HTS (indústria)
- Limitações: 1. Diferenças entre a bioquímica *funcional* de células em cultura e células *in situ* + células de um organismo doente

2. Células recombinantes com alta expressão de receptores: ambiente celular diferente com falta de proteínas “parceiras” !

I. Medida funcional *in vitro*:

1. órgão isolado



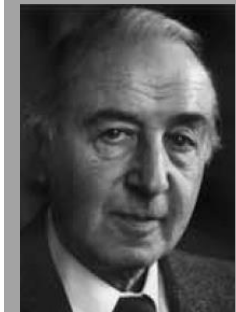
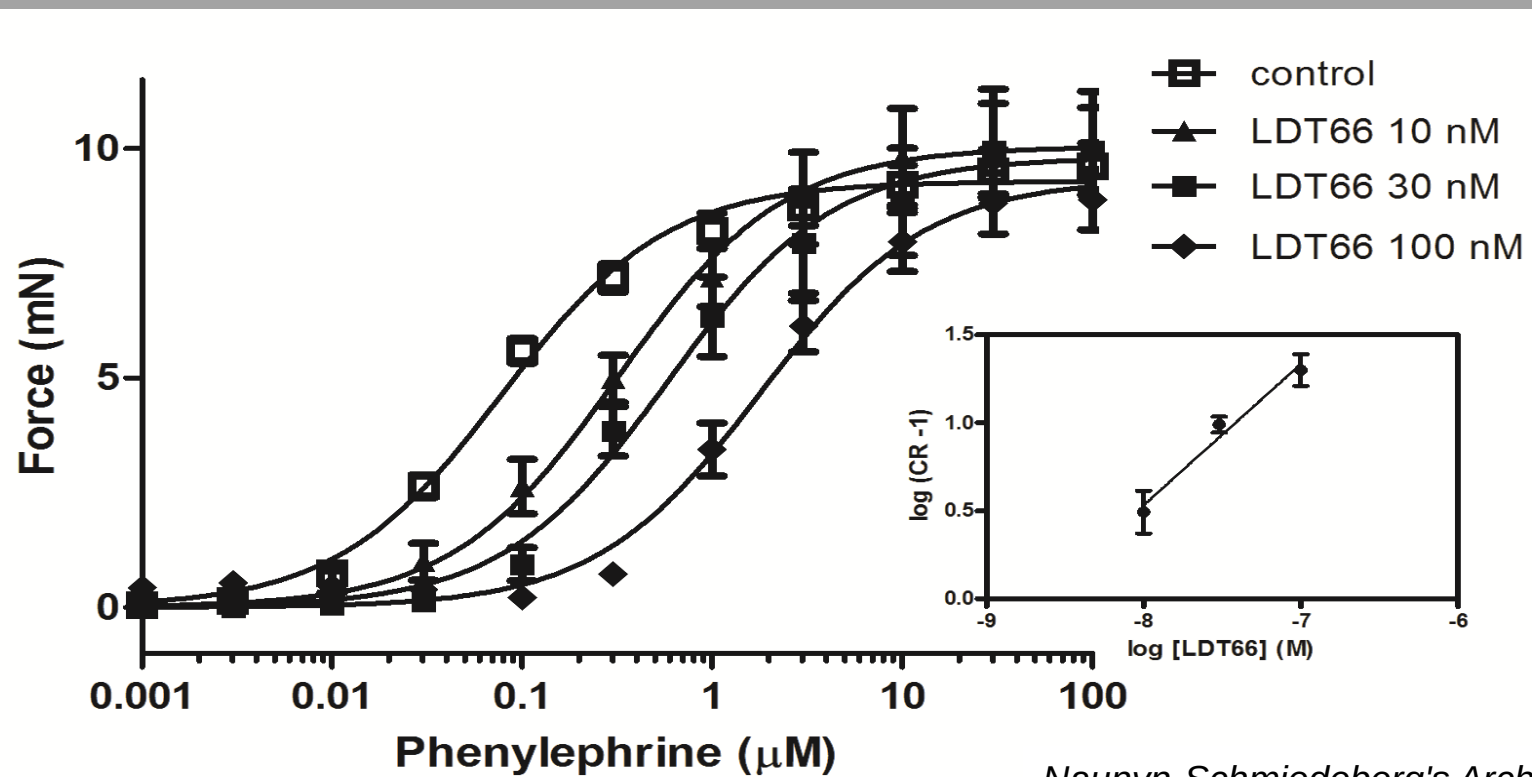
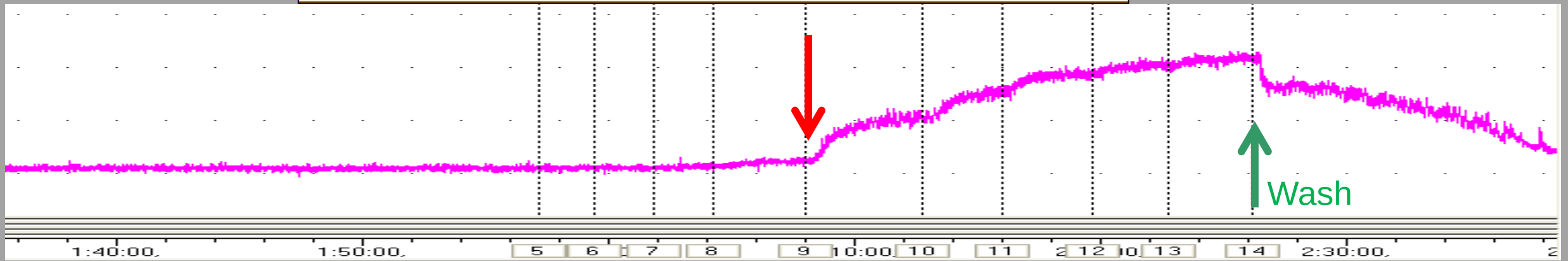
"The guinea pig longitudinal muscle is a great gift to the pharmacologist."

- It has low spontaneous activity; nicely graded responses (not too many tight junctions);
- is highly sensitive to a very wide range of stimulants;
- is tough, if properly handled, and capable of hours of reproducible behaviour."

W. D. M. Paton (1986)

Aorta torácica de rato (AR- α_{1D})

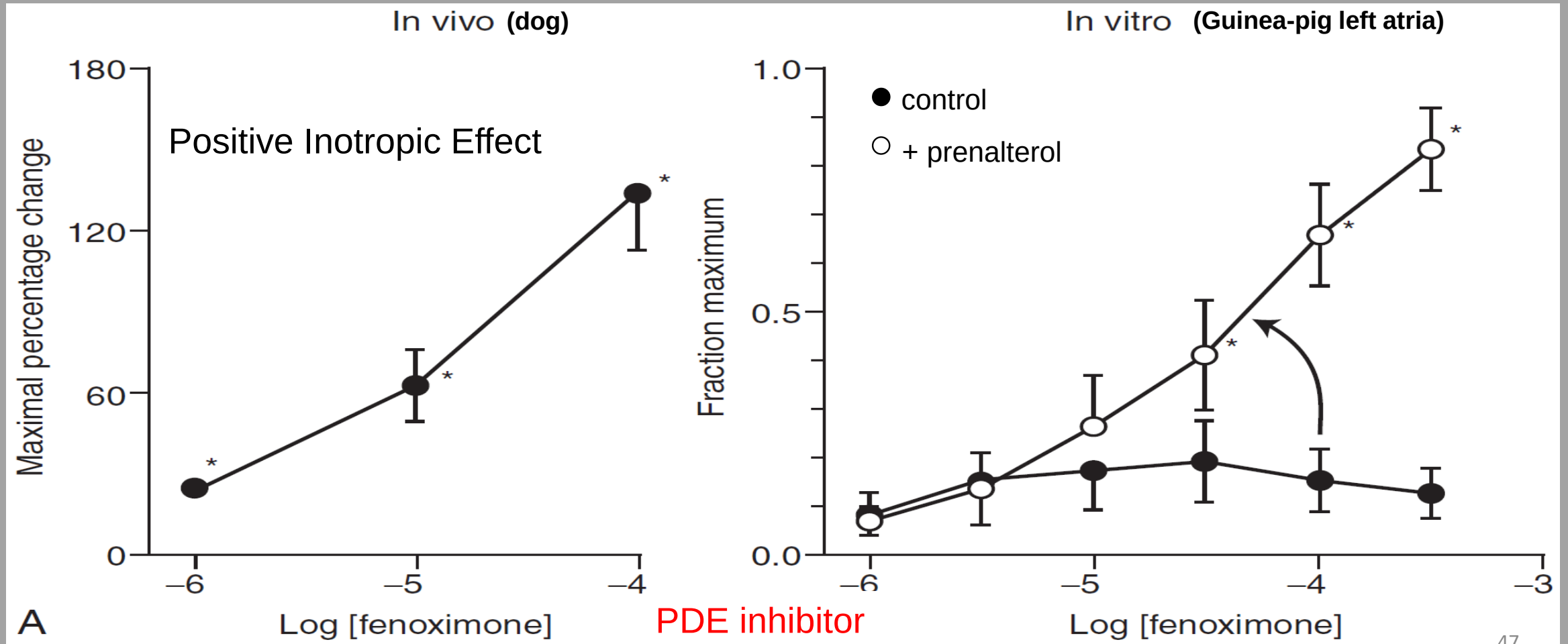
Curva cumulativa à **Fenilefrina**: 10^{-9} – 10^{-5} M



Schild plot
(1959)

CONTEXTO DO ENSAIO

O efeito de um fármaco pode depender do contexto celular (*estimulo basal*) → ! Condições do ensaio de *screening* (*tônus fisiológico*)

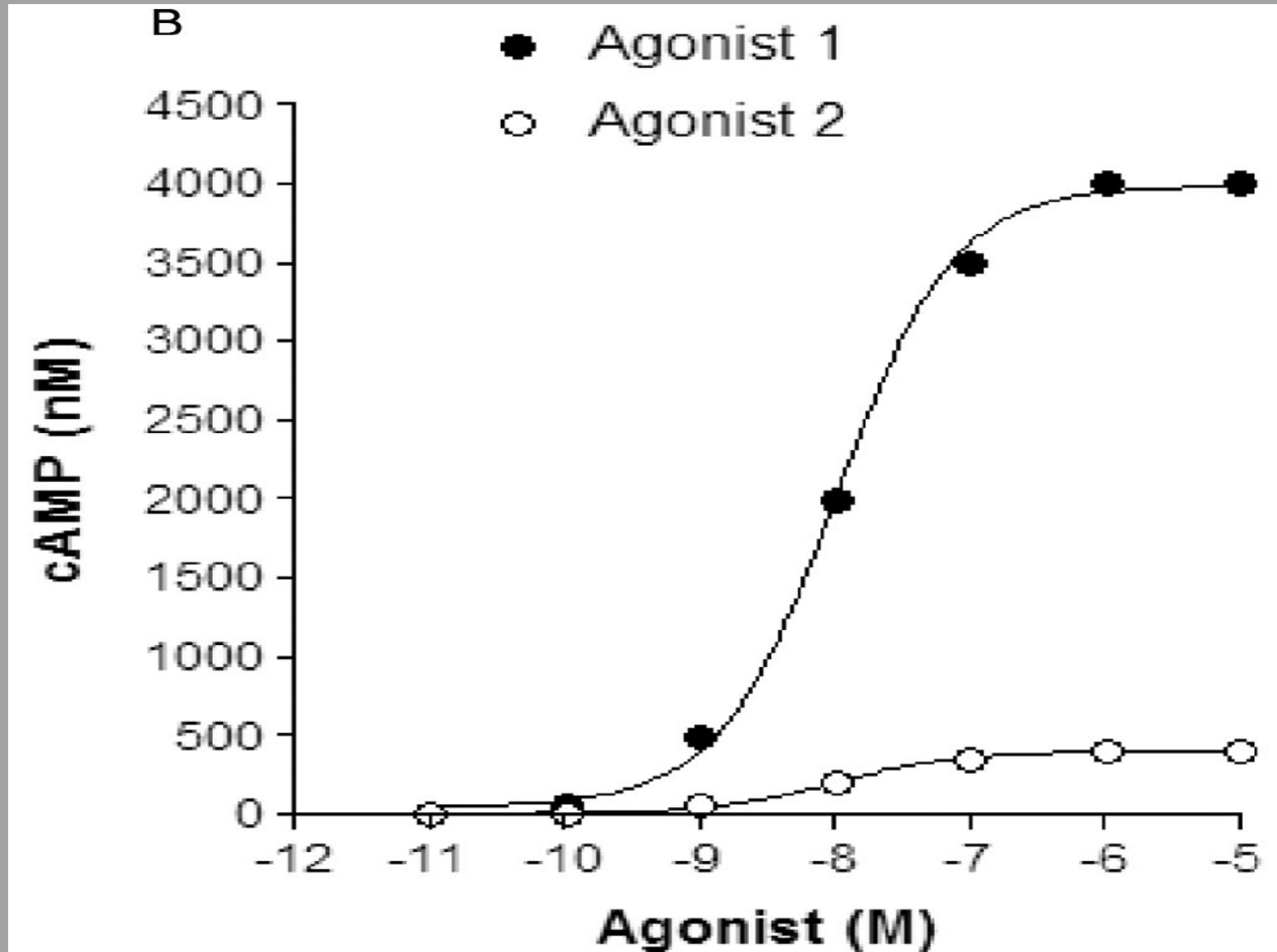


Medida funcional *in vitro*:
2. Célula - Ex: *Patch Clamp*



Medida funcional *in vitro*:

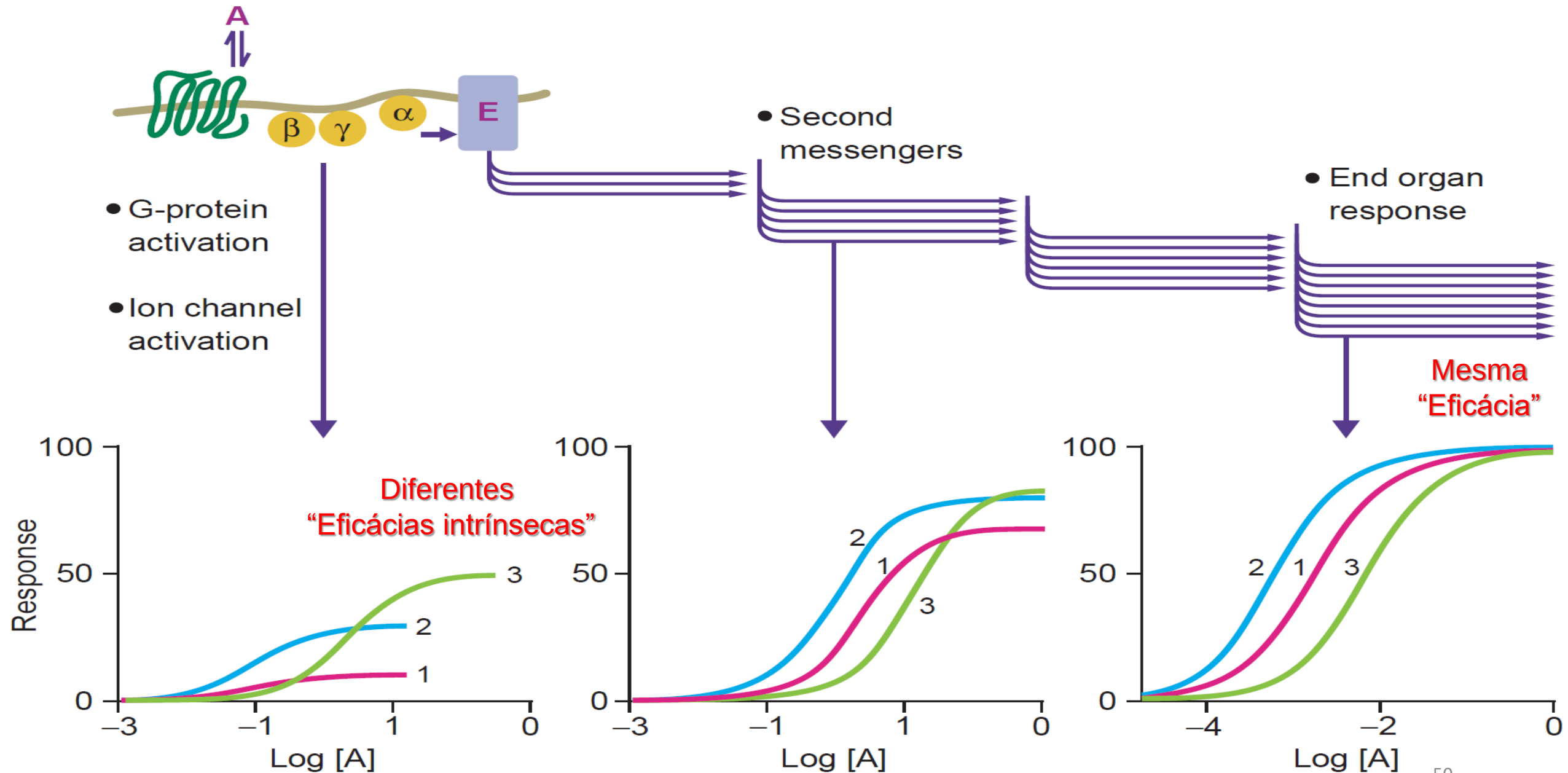
2. Célula - Ex: AMPc



ELISA

(Enzima imunoensaio)

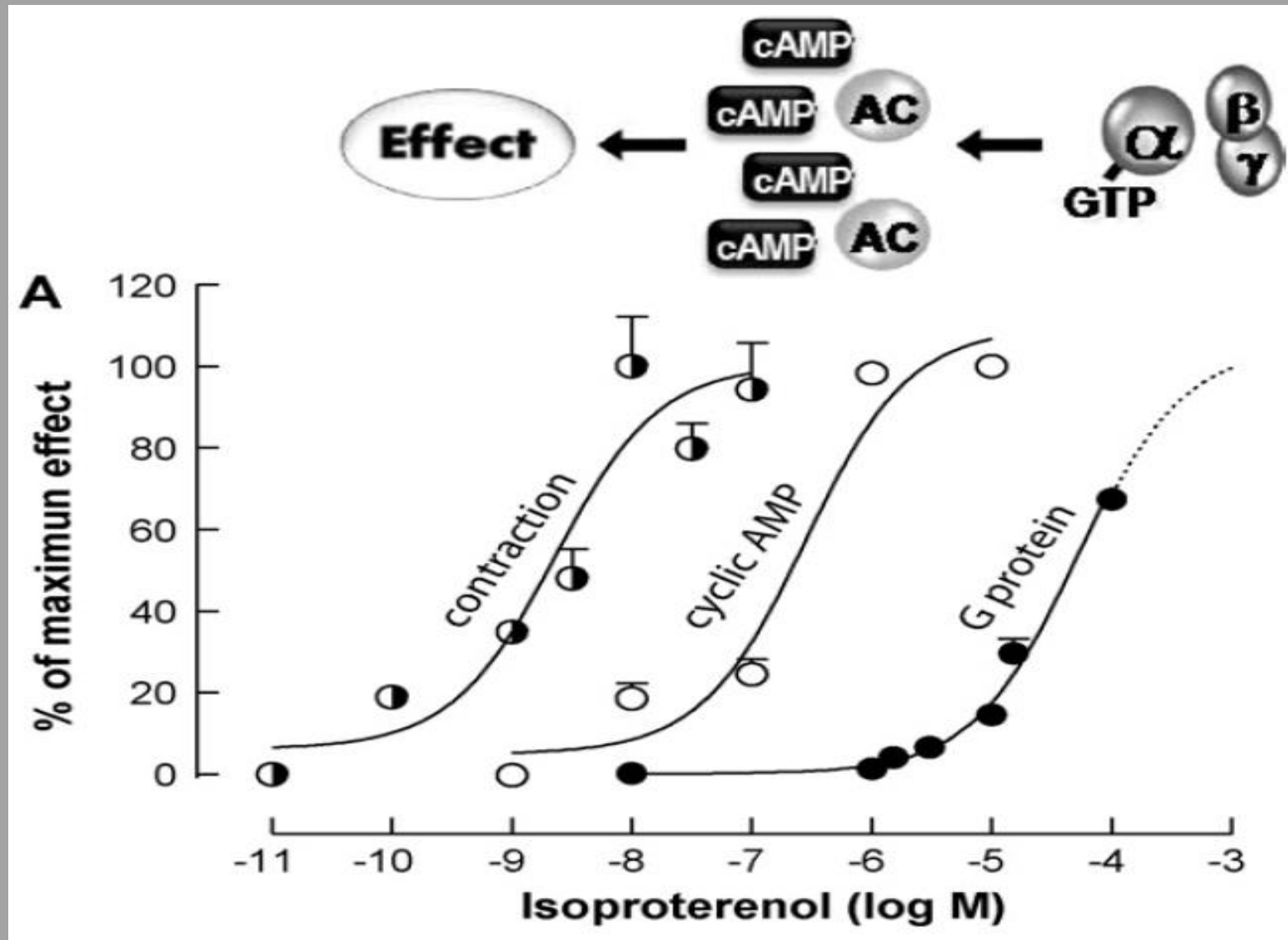
Escolha do ensaio e suas consequências



Functional characterization of heterotrimeric G-proteins in rat diaphragm muscle

Ana Luiza Andrade-Lopes, Marcelo Pires-Oliveira, Francisco Sandro Menezes-Rodrigues, Rosely Oliveira Godinho*

Rat
diaphragm
muscle



II. Ensaios *in vivo*

1. VANTAGENS

Mais próximos da situação clínica – “**indispensáveis**”

2. DESVANTAGENS

Screening: custo, tempo, escala (*falta de robotização*), quantidade de substância

3. CUIDADOS

- MODELOS ANIMAIS TRADICIONAIS

Validação !! (translacionalidade ?)

- CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

As alterações observadas após modificação de 1 gen variam muito em função da cepa de camundongo

Fenômenos compensatórios

ESTRUTURA DA AULA

OBJETIVO: visão geral, atual e crítica do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, com ênfase nas etapas de descoberta e estudos pré-clínicos

TÓPICOS:

- DD&D: introdução e desafios
- Estratégias para planejamento sintético
- Tipos de ensaios farmacológicos
- Ensaio a serem realizados (*in silico, in vitro e in vivo*), com fluxograma



1. IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS (HITS)

- 1.A. Identificação e validação do alvo
- 1.B. Identificação de substâncias ativas (*hits*)
- 1.C. Propriedades físicoquímicas *in silico*

2. DE HITS PARA PROTÓTIPOS (LEADS)

- 2.A. Ensaio celular (ou animal) da doença
- 2.B. Relação Estrutura-Atividade
- 2.C. Propriedades físicoquímicas *in vitro*
- 2.D. Seletividade
- 2.E. Genotoxicidade *in vitro*

3. OTIMIZAÇÃO DE PROTÓTIPOS (LEADS)

- 3.A. Modelo animal da doença
- 3.B. ADME *in vitro*
- 3.C. ADME *in vivo*
- 3.D. Citotoxicidade
- 3.E. Toxicidade aguda
- 3.F. Genotoxicidade *in vitro*
- 3.G. Desenvolvimento farmacêutico e *scale-up*

4. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS (DEFINIÇÃO DO CANDIDATO A FÁRMACO)

- 4.A. Excreção e identificação de metabólitos *in vivo*
- 4.B. Distribuição tecidual *in vivo*
- 4.C. Toxicidade subcrônica e toxicocinética
- 4.D. Genotoxicidade *in vivo*
- 4.E. Toxicologia reprodutiva 1
- 4.F. Segurança *in vivo*
- 4.G. Desenvolvimento de formulação

5. ENSAIO CLÍNICO DE FASE 1

- 5.A. Ensaio clínico de fase 1

6. ENSAIO CLÍNICO DE FASE 2

- 6.A. Ensaio clínico de fase 2
- 6.B. Toxicidade subcrônica (3-6 meses)

7. ENSAIO CLÍNICO DE FASE 3

- 7.A. Ensaio clínico de fase 3
- 7.B. Toxicologia reprodutiva 2
- 7.C. Toxicidade crônica
- 7.D. Carcinogenicidade

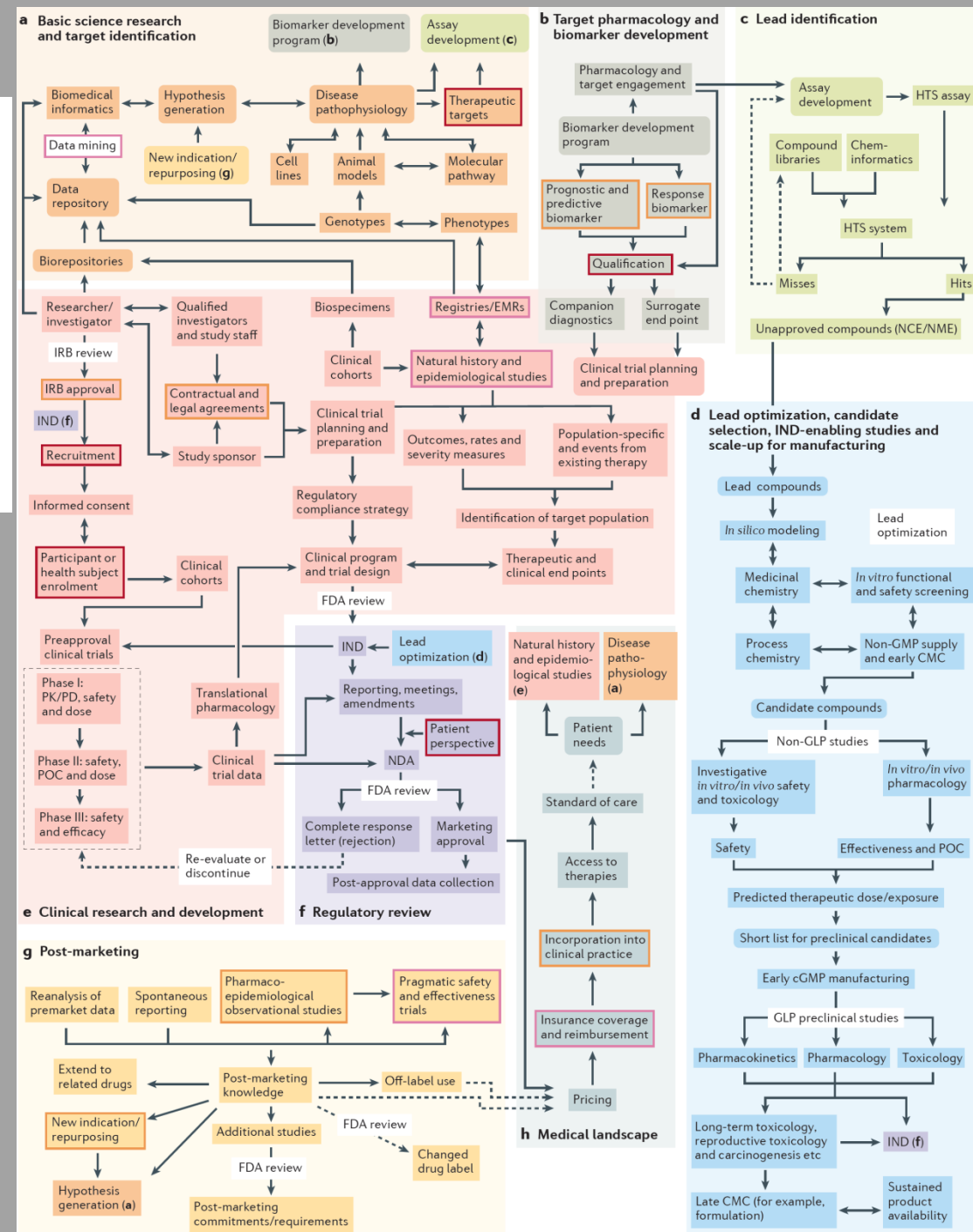
An End to the Myth: There Is No Drug Development Pipeline

Kristin Baxter,^{1,2} Elizabeth Horn,¹ Neely Gal-Edd,¹ Kristi Zonno,^{1,3} James O'Leary,¹ Patrick F. Terry,⁴ Sharon F. Terry^{1*}

A dynamic map for learning, communicating, navigating and improving therapeutic development

John Wagner, Andrew M. Dahlem, Lynn D. Hudson, Sharon F. Terry, Russ B. Altman, C. Taylor Gilliland, Christopher DeFeo and Christopher P. Austin

Drug Discovery, Development & Deployment Map (4D Map)

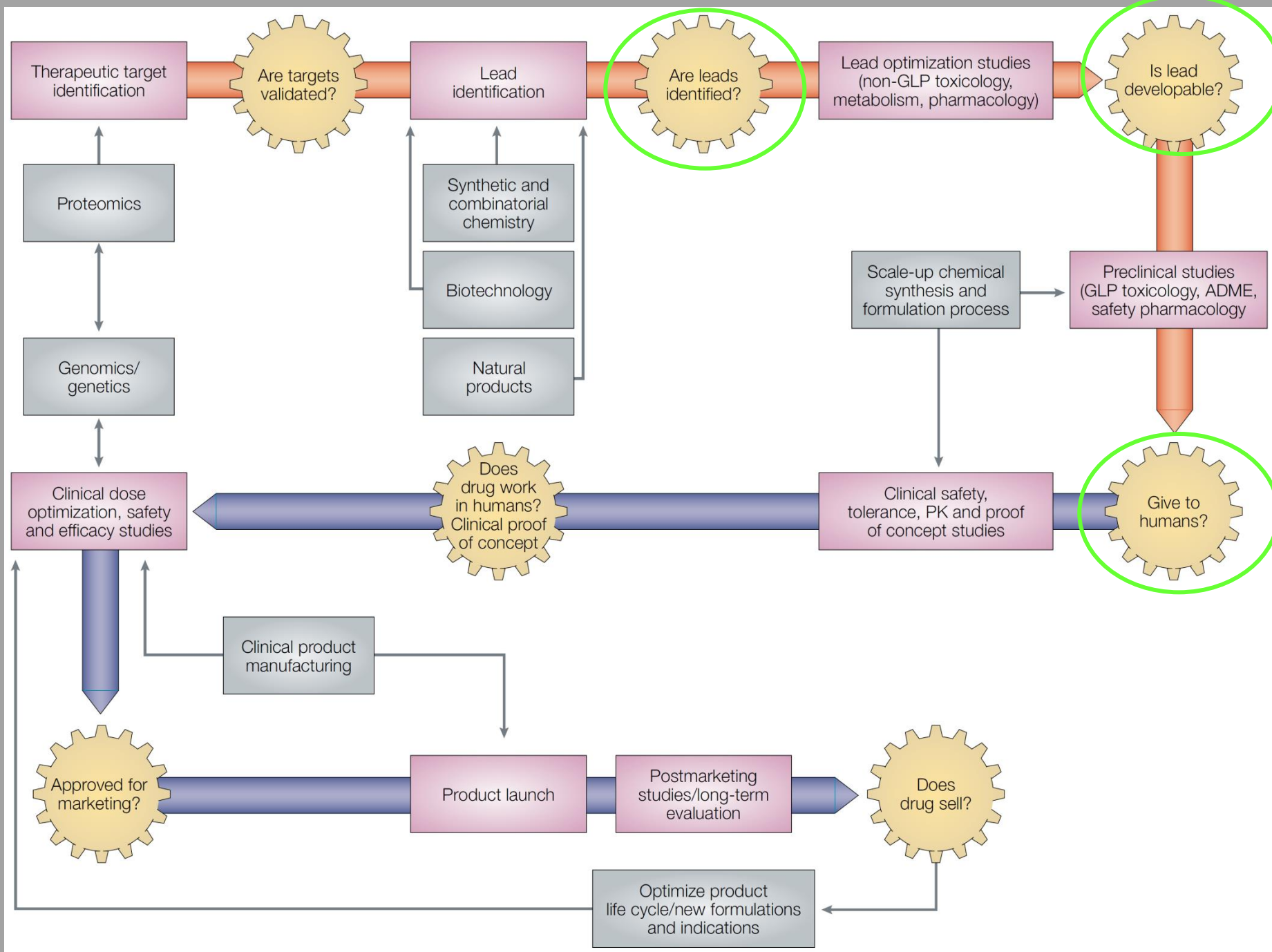


MAKING BETTER DRUGS: DECISION GATES IN NON-CLINICAL DRUG DEVELOPMENT

J. Fred Pritchard^{}, Malle Jurima-Romet[‡], Mark L. J. Reimer[‡], Elisabeth Mortimer[§],
Brenda Rolfe[‡] and Mitchell N. Cayen^{||}*

A GUIDE TO DRUG DISCOVERY





“go / no-go” ?

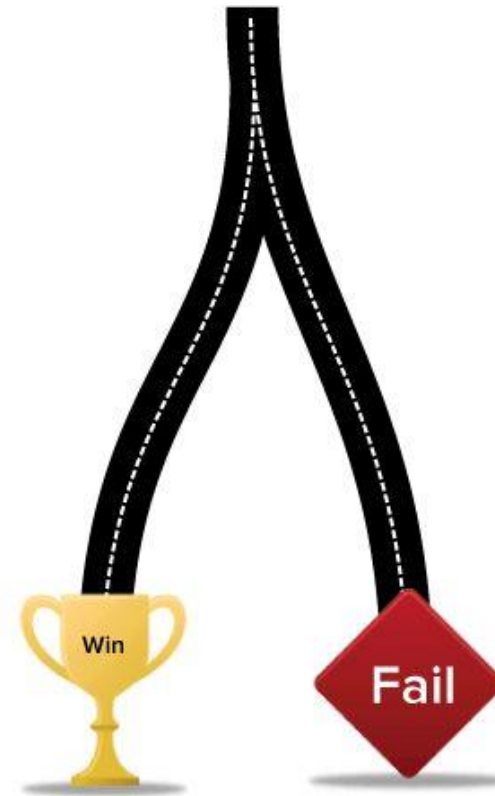
“go / no-go” ?

The “go / no-go” decision

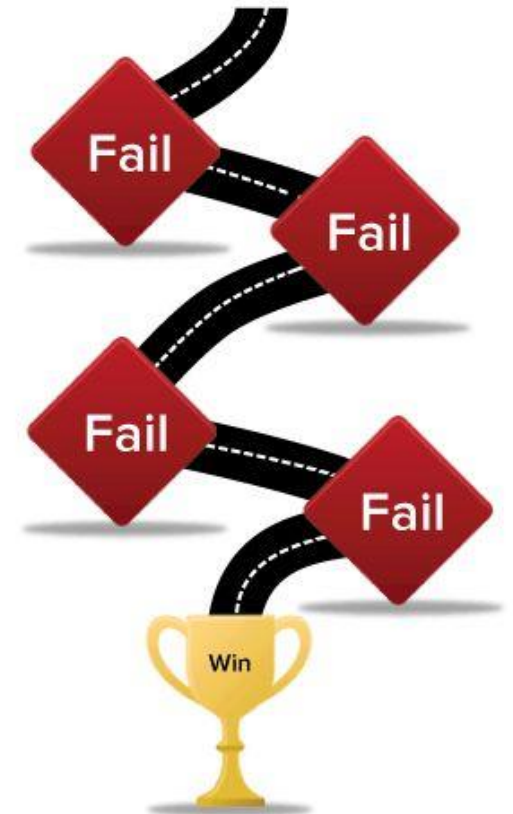
“Fail fast, fail often”

(mantra of silicon valley)

What Most
People Think



What Successful
People Know



@douglaskarr

“Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm”

O sucesso é a capacidade de ir de um fracasso a outro sem perder o entusiasmo



Winston Churchill
(1874-1965)

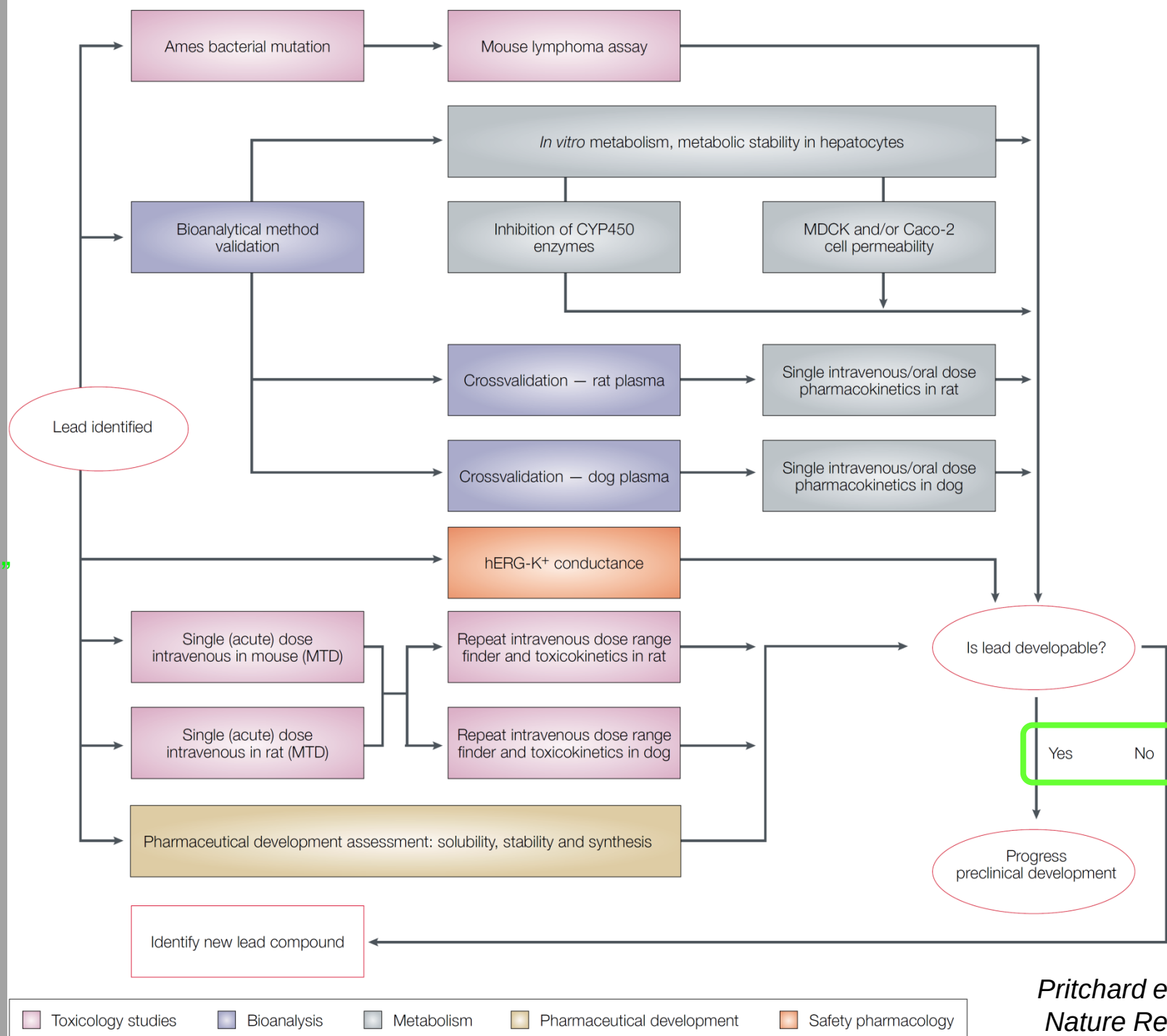
Análise FOFA

(Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças)

	Fatores Positivos	Fatores Negativos
Fatores Internos	Forças (Strenghts)	Fraquezas (Weakness)
Fatores Externos	Oportunidades (Opportunities)	Ameaças (Treaths)

1. Is lead developable ?

"= Lead optimization"



1. Is lead developable ?

"= Lead optimization"

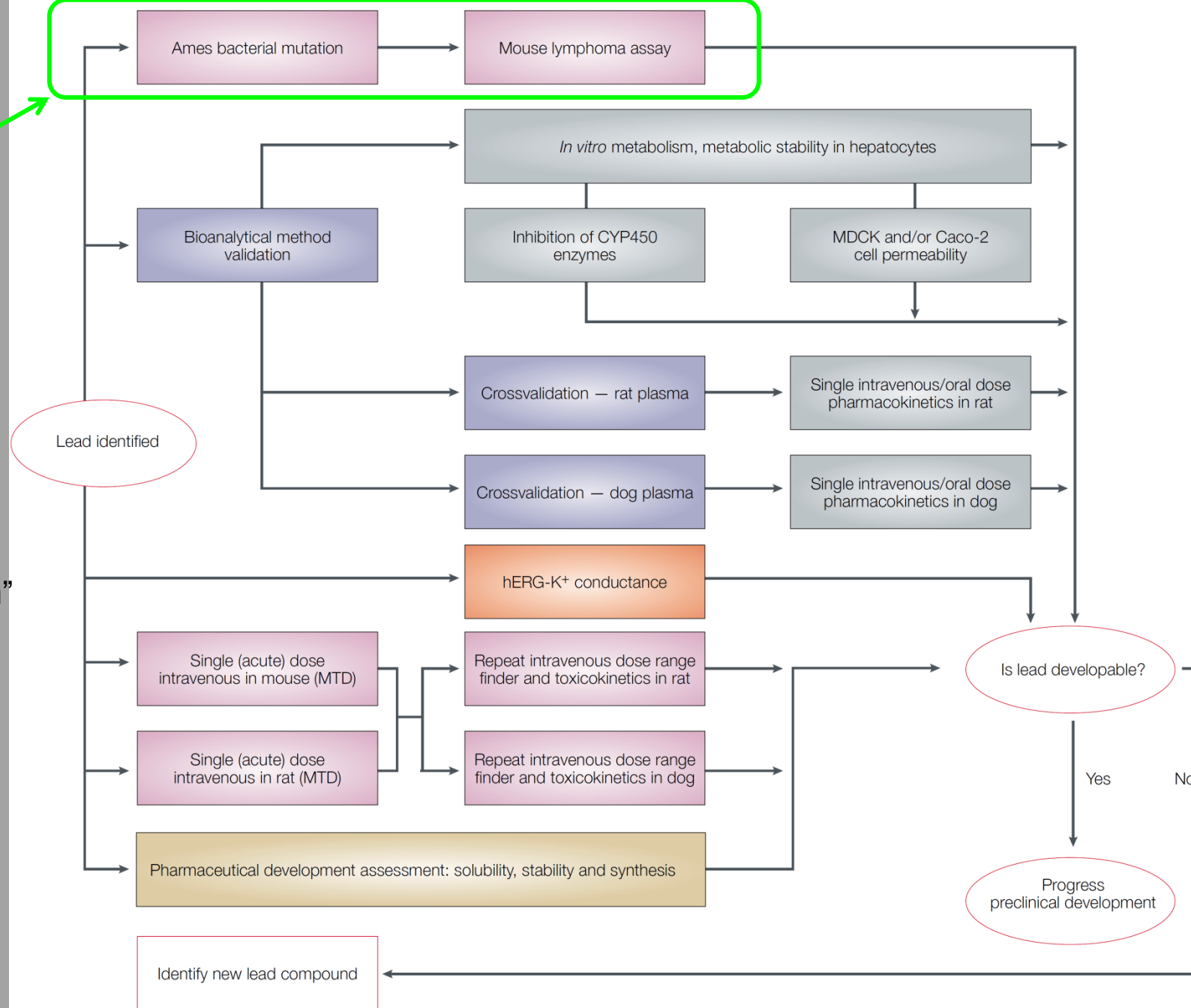
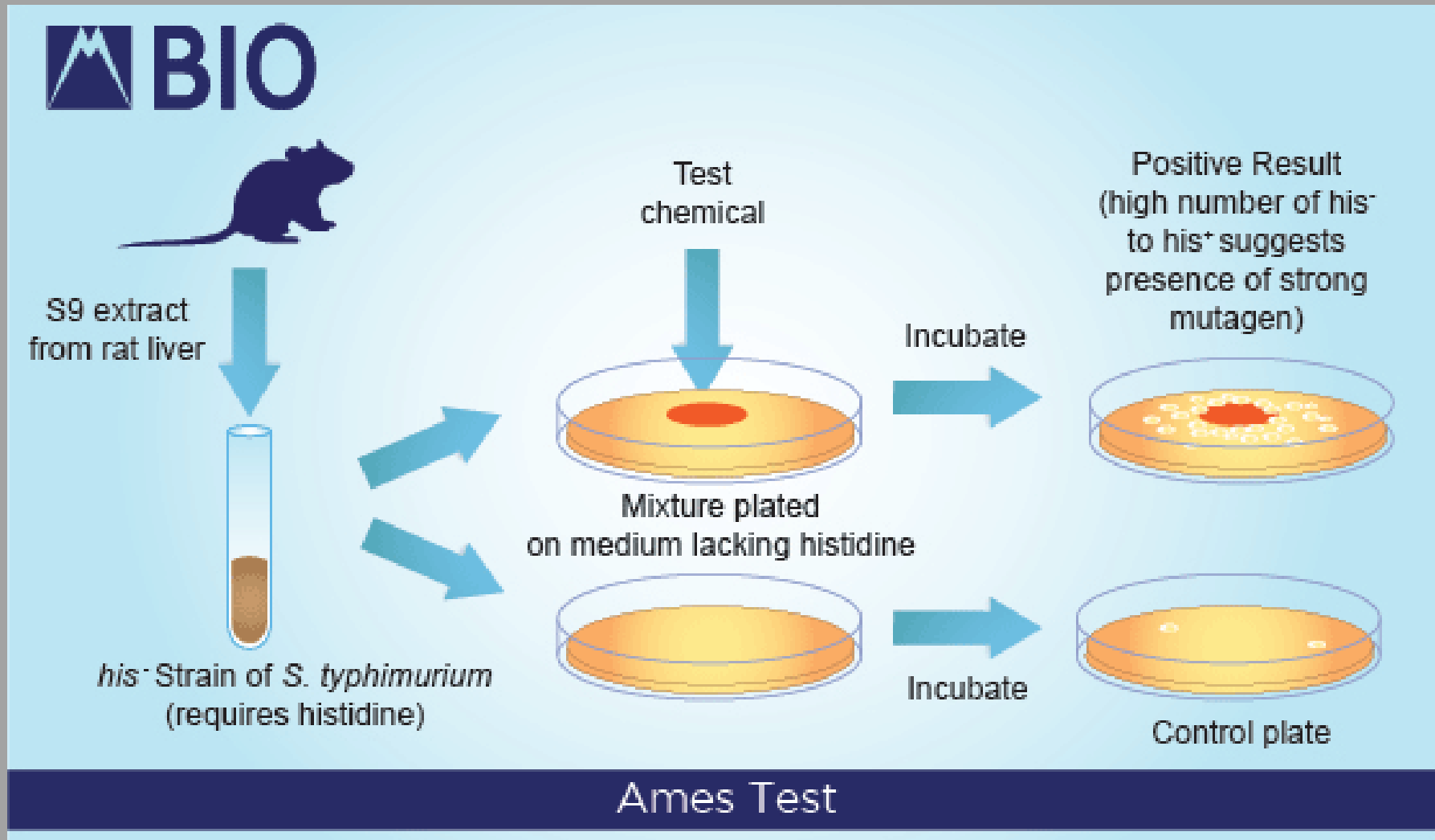


Table 3. Standard genotoxicity testing battery (Custer and Sweder, 2008)

Test	Purpose
<u>Ames</u> bacterial mutation assay	Evaluation of Gene mutation
<u>Mouse lymphoma</u> assay (MLA), Chinese hamster ovary (CHO) chromosomal aberration assay	Evaluation of Gene mutation + chromosomal damage
Micronucleus test (MNT)	Evaluation of in vivo chromosomal damage in bone marrow polychromatic erythrocytes

Teste de Ames:

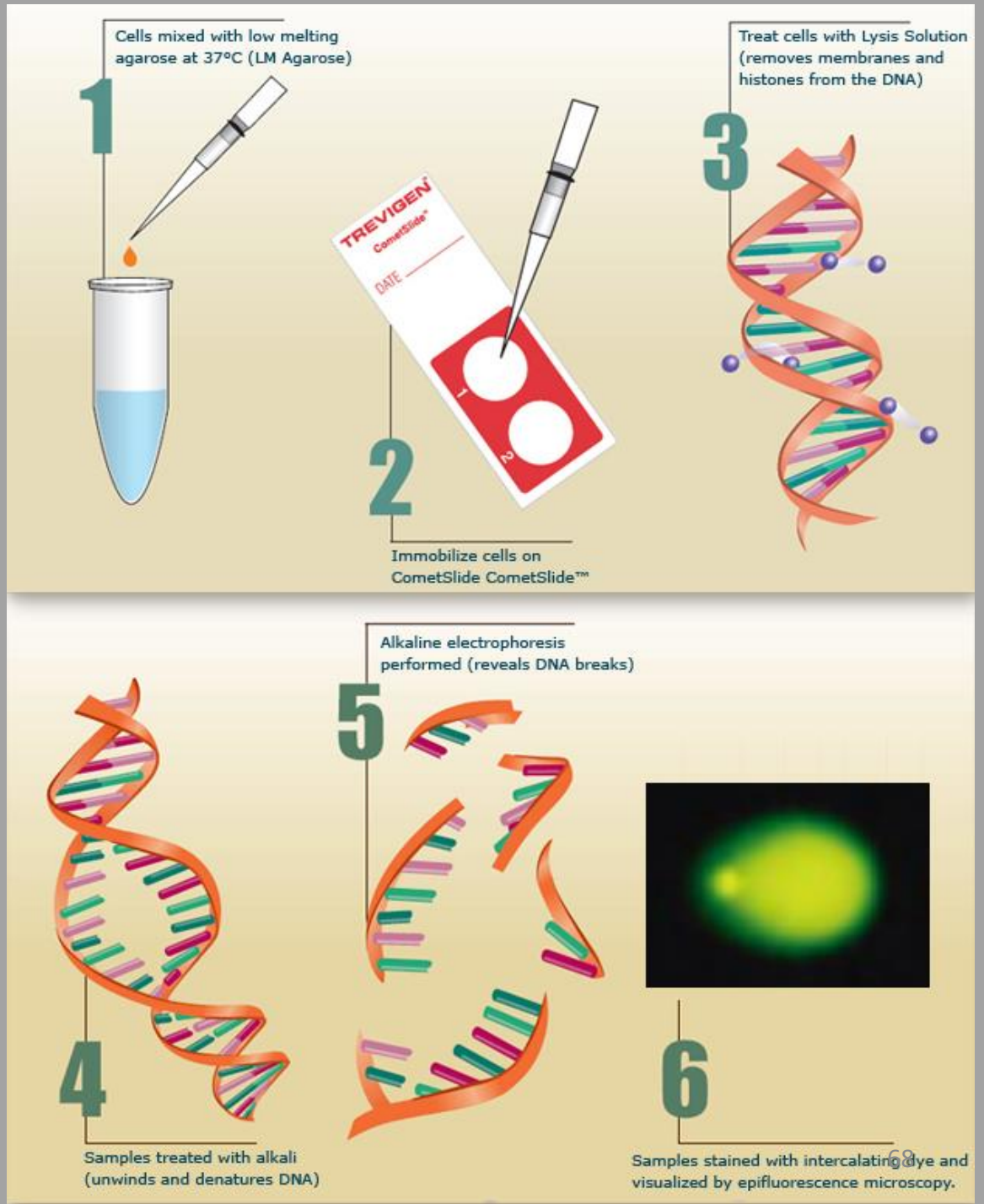
Muito econômico, é um dos testes *in vitro* de curta duração mais utilizados para detectar mutagenicidade.



Ensaio do Cometa

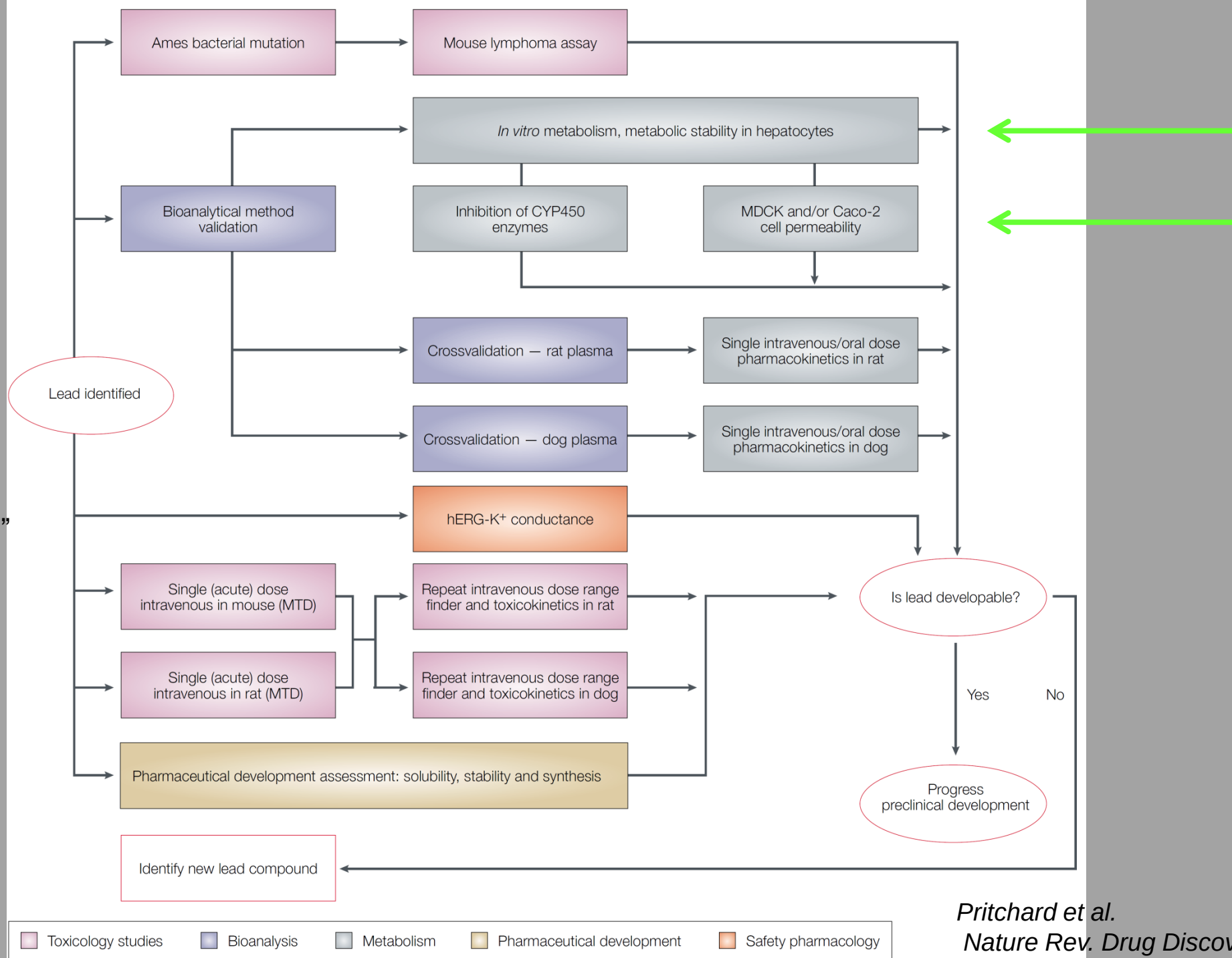
Objetivo: Identificar danos no material genético (DNA) em célula de mamífero

Alta sensibilidade mas falsos positivos



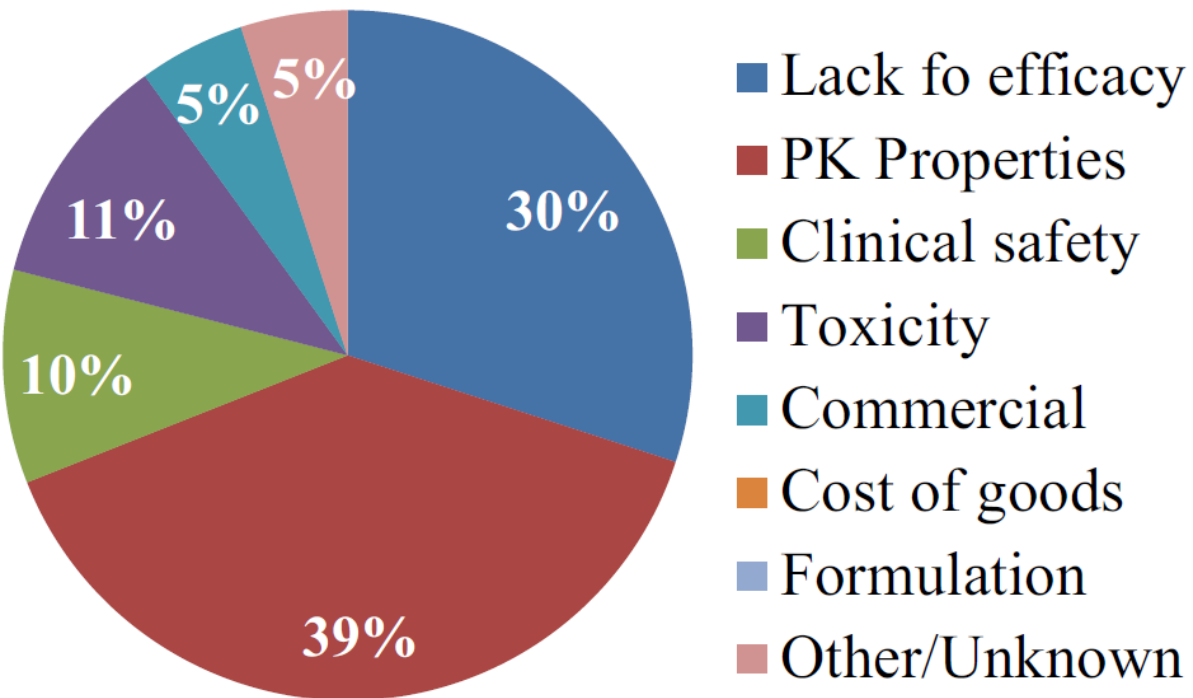
1. Is lead developable ?

"= Lead optimization"

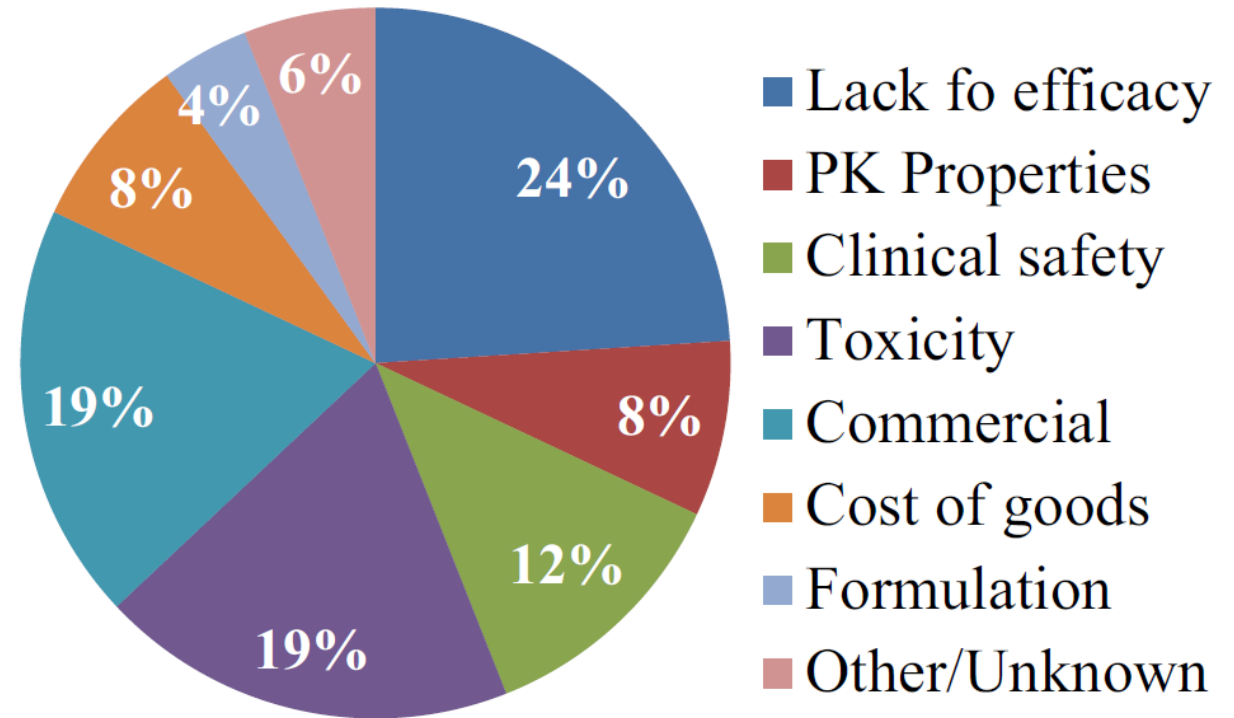


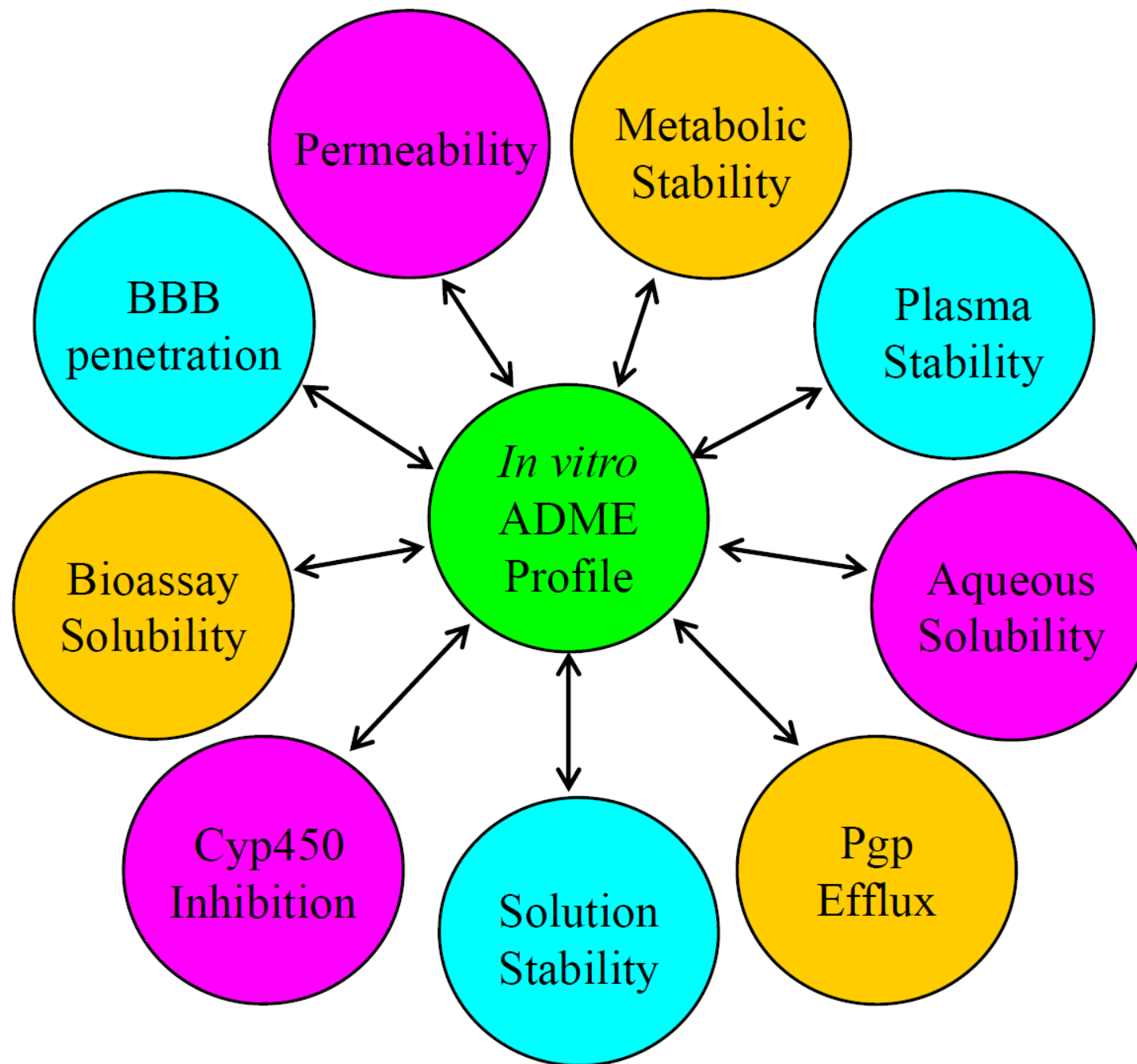
Importância de avaliar a farmacocinética de forma precoce em projeto de descoberta de fármacos

1991



2000





ADME: A. Propriedades fisicoquímicas *in silico*

Lipinski's
rule of 5

Property	Target values
MW (Da)	≤ 500 *
clogP	≤ 5 *
Log D _{7.4}	0 - 3
H-bond donor	≤ 5 *
H-bond acceptor	≤ 10 *
Water solubility	>100 μ M
Polar Surface Area ($\text{\AA}^2$)	< 140
Freely Rotation Bonds	≤ 10

0 - 2 (BHE)

< 80 (BHE)

Veber's rule

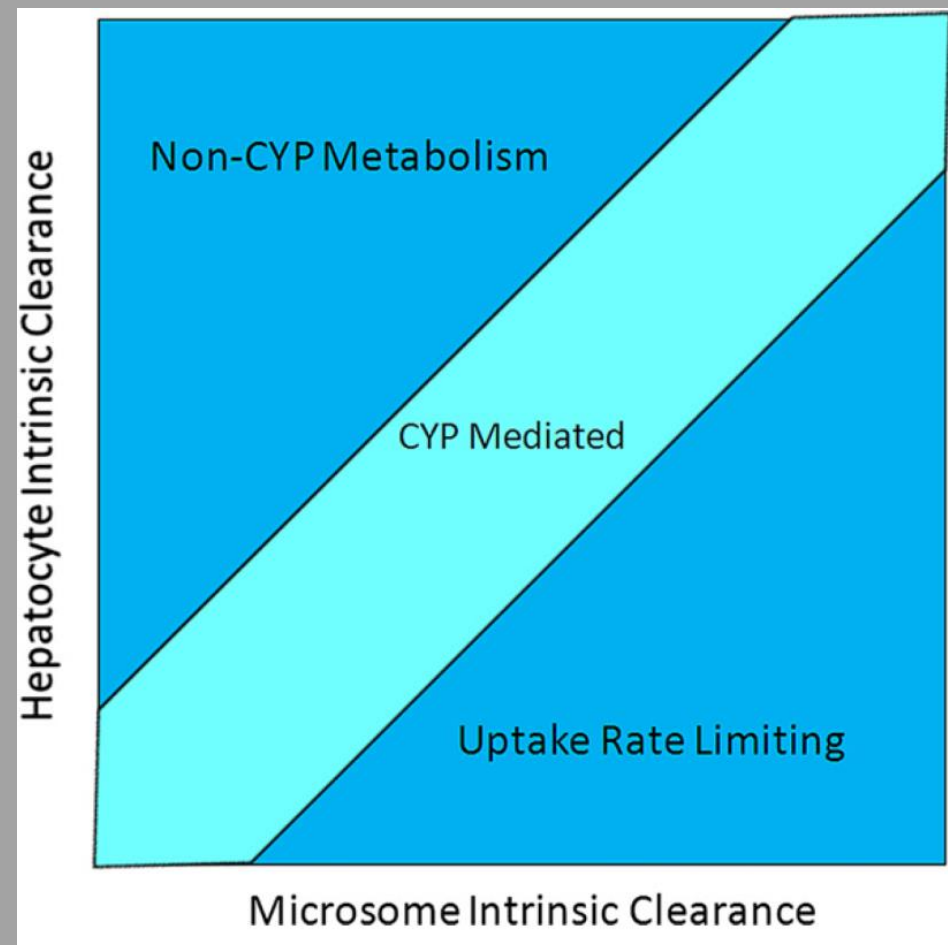
ADME: B. *in vitro* properties

In vitro stability / metabolism

- rat and human Microsomes
 $Cl_{int} < 30 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein
- rat and human hepatocytes

CYP450 profiling and inhibition

- human ($> 10 \mu\text{M}$)



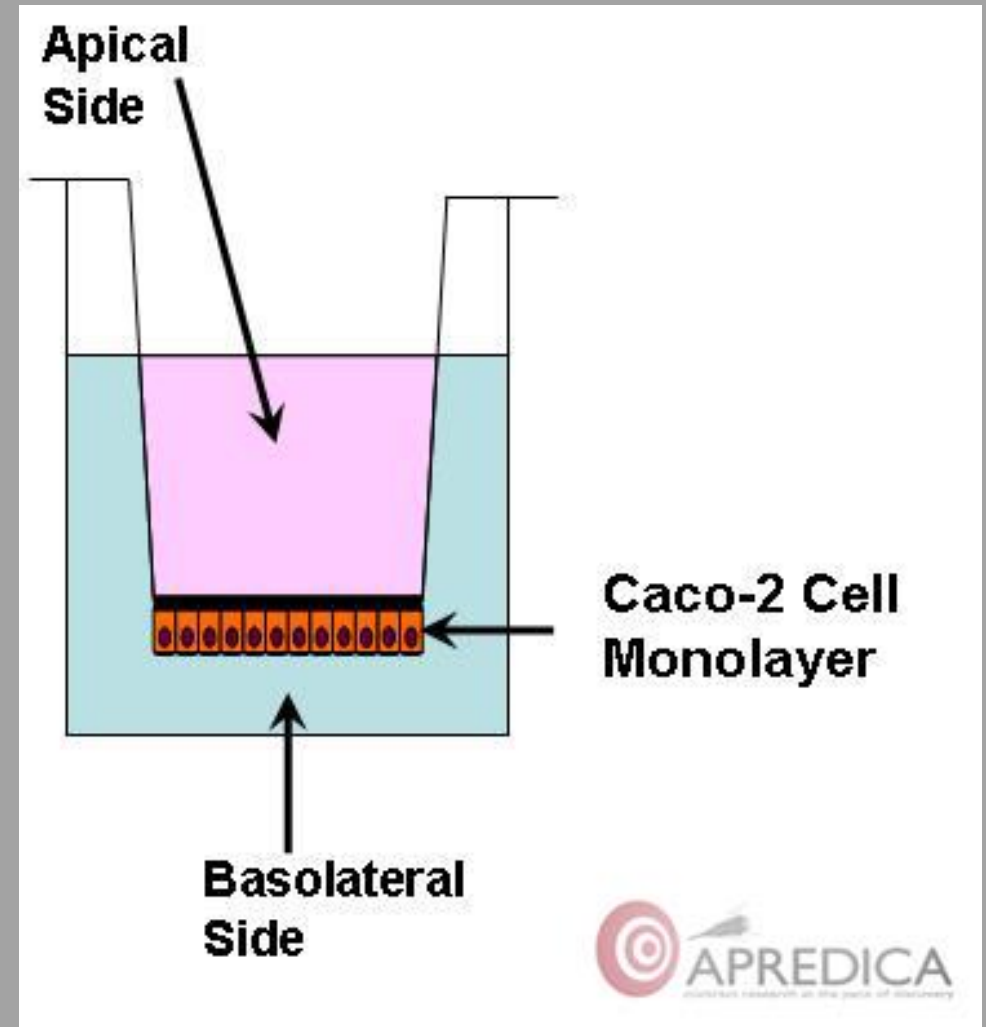
In vitro Permeability assay

- Caco-2 cells
- MDCK / MDCK-MDR1 cells

$$P_{\text{app}} > 1\text{-}10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

$$\text{asymmetry} < 2$$

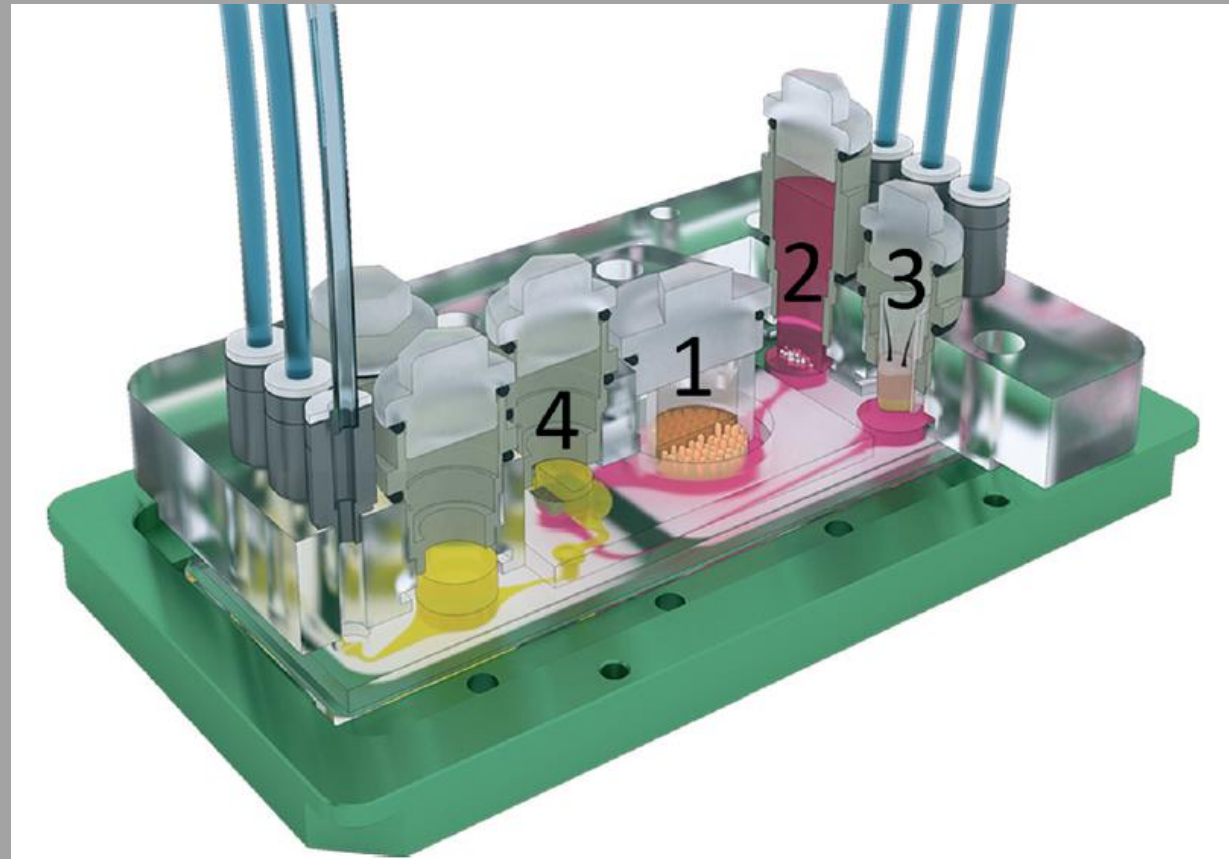
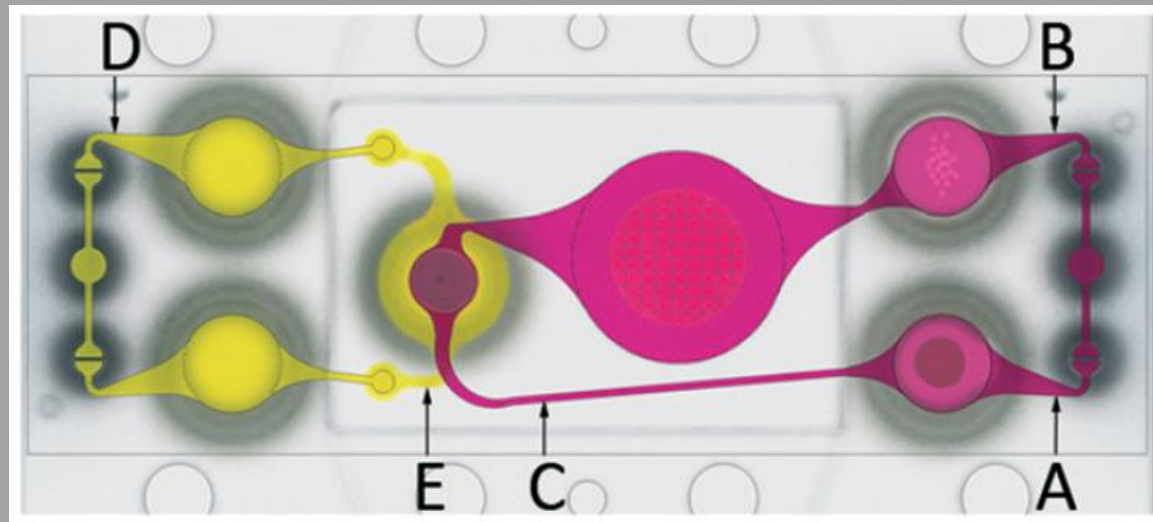
- (PAMPA)



A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents

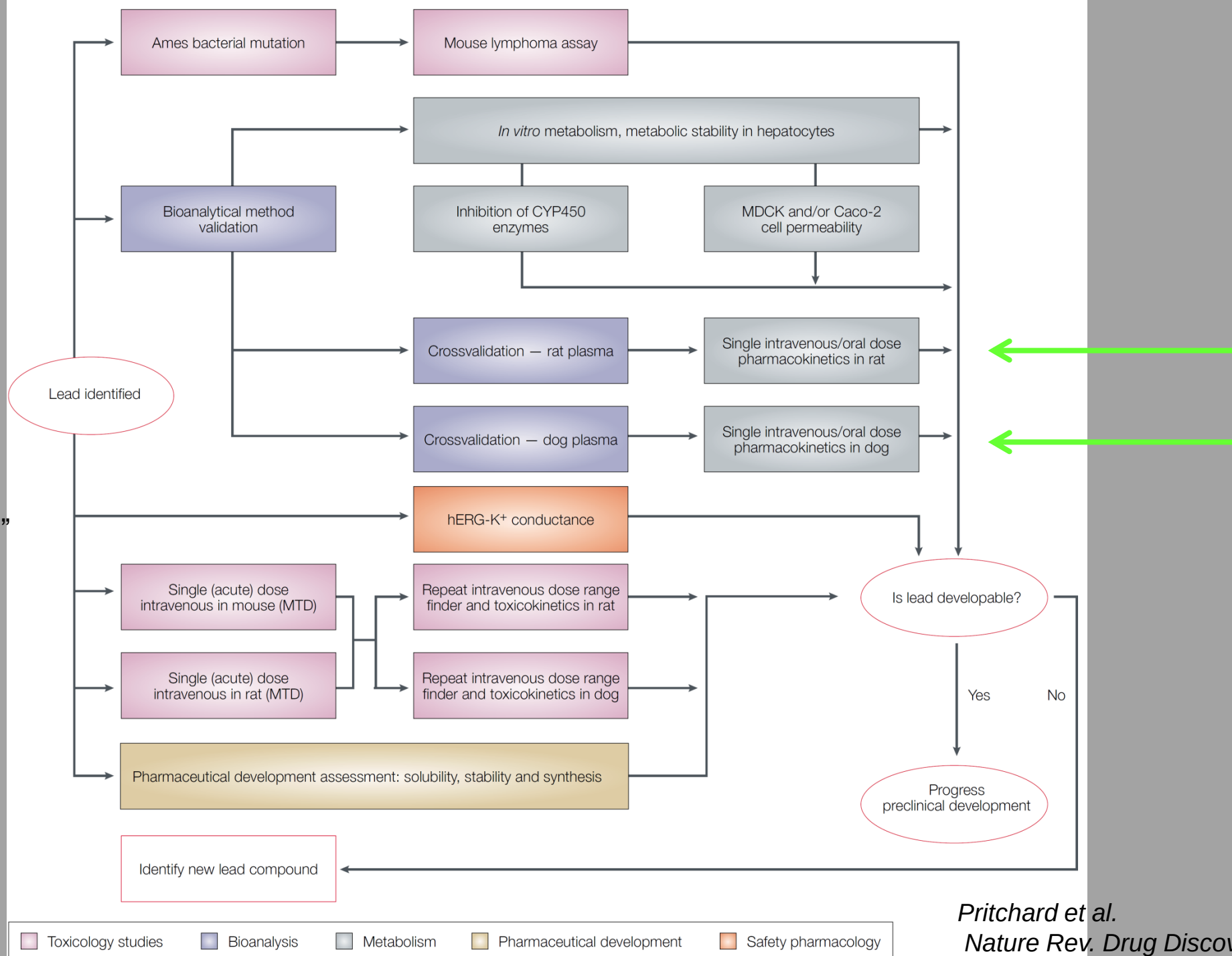
Ilka Maschmeyer,^{*ab} Alexandra K. Lorenz,^{ab} Katharina Schimek,^a Tobias Hasenberg,^{ab} Anja P. Ramme,^{ab} Juliane Hübner,^a Marcus Lindner,^a Christopher Drewell,^a Sophie Bauer,^a Alexander Thomas,^a Naomia Sisoli Sambo,^a Frank Sonntag,^c Roland Lauster^a and Uwe Marx^{ab}

Lab Chip, 2015, **15**, 2688



Is lead
developable ?

"= Lead optimization"

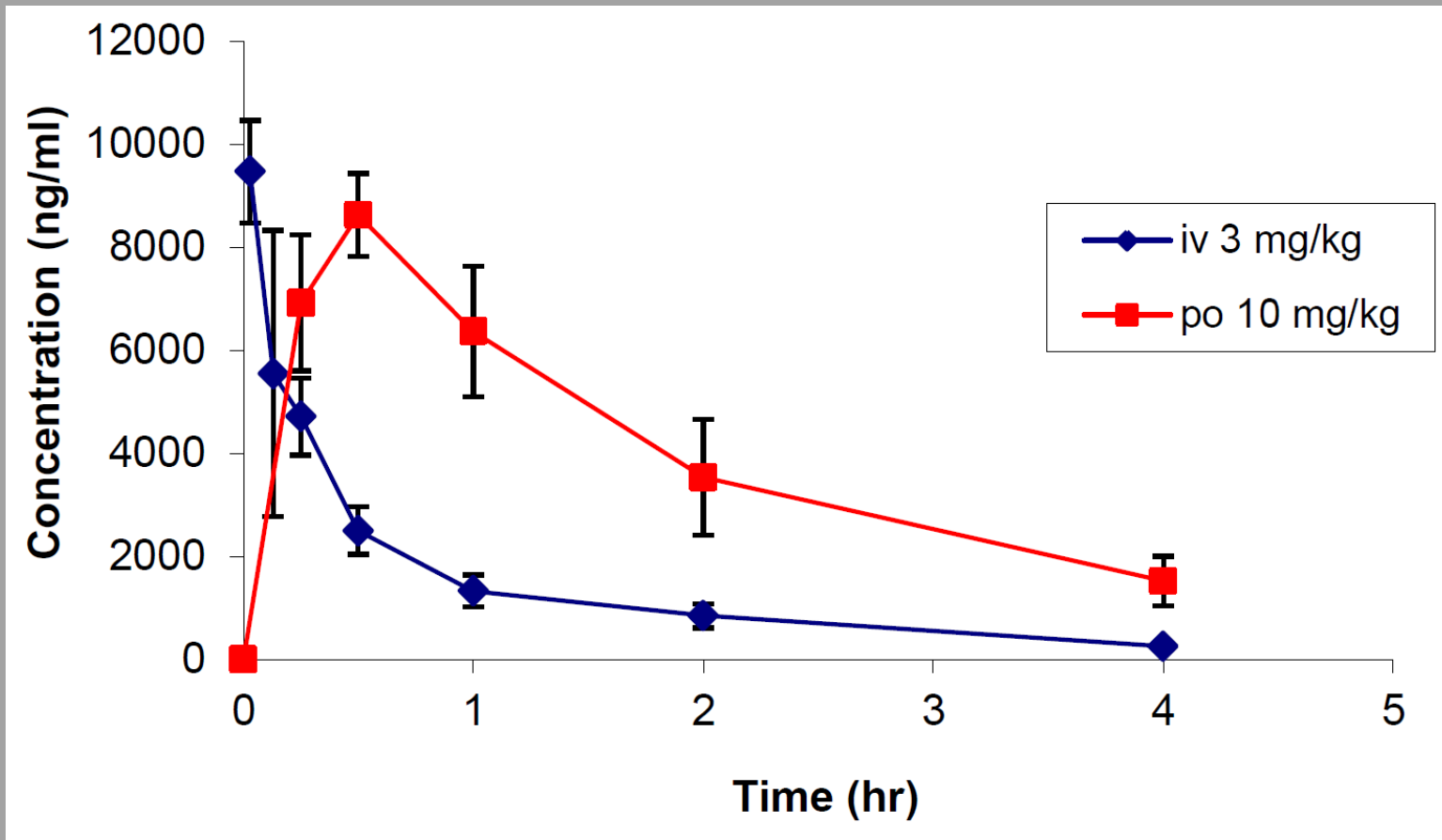


Farmacocinética *in vivo*

Rato e Cachorro:

Dose única (p.o. vs i.v.)

Dose ?: 3 mg/Kg (i.v.) and 10 mg/Kg (p.o.) (*McVean, 2013*).



Allometric Scaling of Pharmacokinetic Parameters in Drug Discovery: Can human CL, V_{ss} and $t_{1/2}$ be predicted from *In-vivo* Rat Data?

GARY W. CALDWELL, JOHN A. MASUCCI, ZHENGYIN YAN and WILLIAM HAGEMAN

Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, L.L.C. Drug Discovery, Spring House, USA

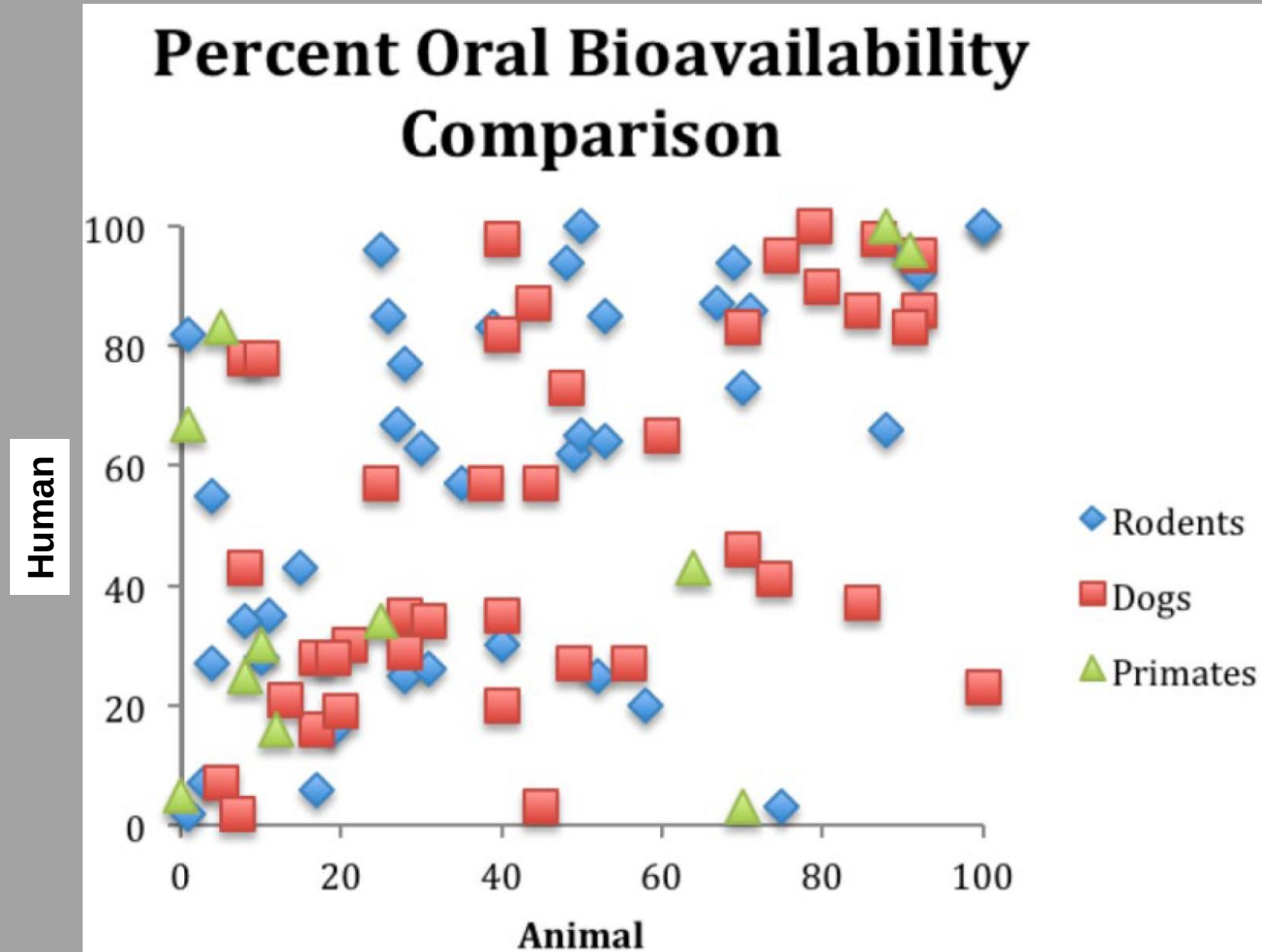
following simple allometric scaling equations (13 – 15) can be derived and used to predict human CL, V_{ss} and $t_{1/2}$ solely from rat in-vivo data.

$$CL_{\text{Human}} \approx 40 CL_{\text{Rat}} \quad (\text{L/hr}) \quad (13)$$

$$V_{ss \text{ Human}} \approx 200 V_{ss \text{ Rat}} \quad (\text{L}) \quad (14)$$

$$t_{1/2 \text{ Human}} \approx 4 t_{1/2 \text{ Rat}} \quad (\text{hr}) \quad (15)$$

PK: diferenças entre espécies (F)



1. Is lead developable ?

"= Lead optimization"

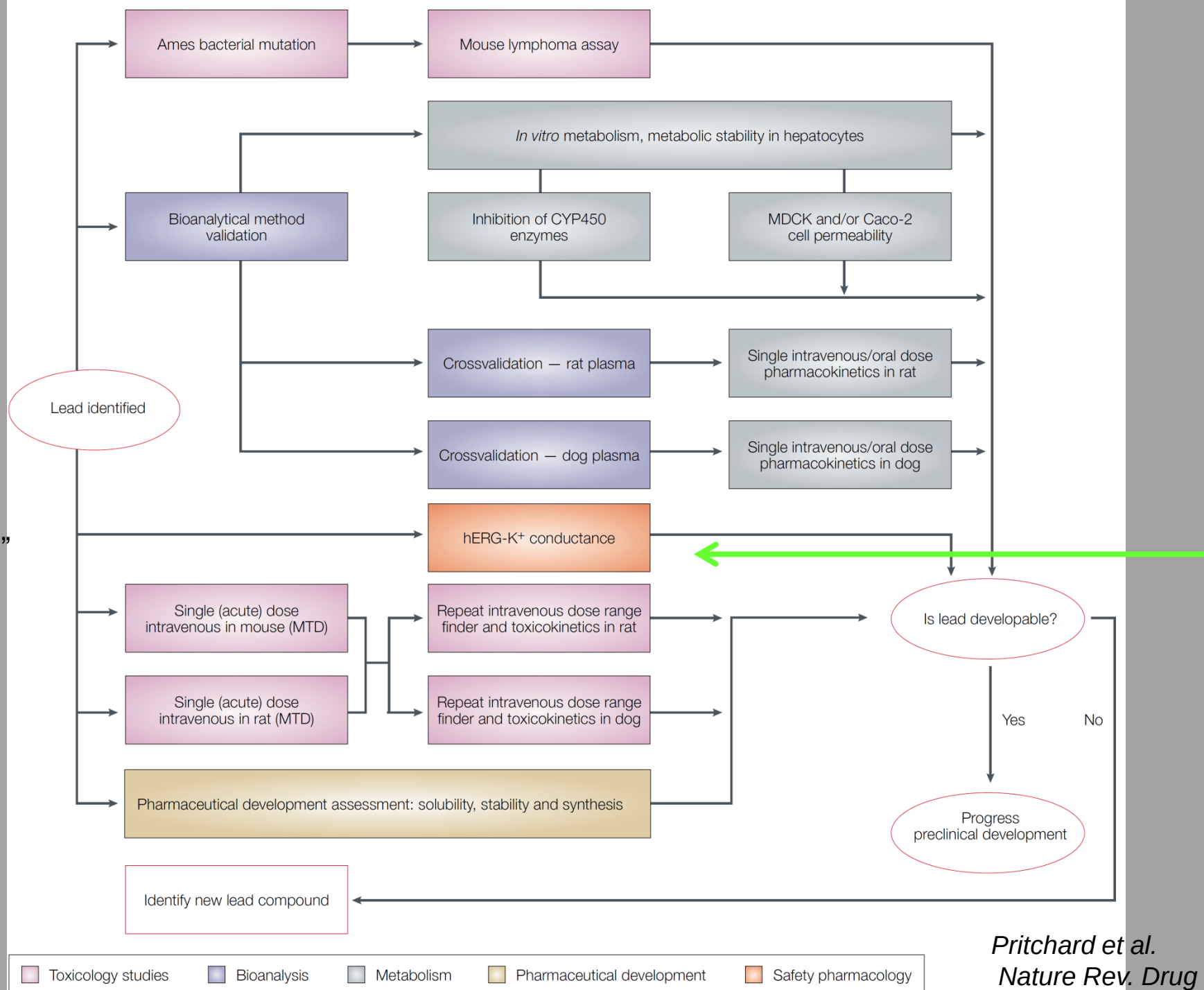


Table 1. Routine exploratory safety studies

In silico

Genetic toxicology

SAR alerts using *in silico* tools
Mutagenicity assay: Bacterial
reverse mutation

Clastogenicity assay: *in vitro*
mammalian cell assay

Safety pharmacology

In vitro: Receptor binding,
Ion channel assays

Ex vivo: Tissue/organ studies

In vivo: cardiovascular,
neurobehavioral
and respiratory studies

General toxicology

Rodent and Non-rodent:
MTD and DRF studies

MTD, maximal tolerated
dose; DRF, dose-range finding.

SAFETY: A. De-Risking (*in vitro*)

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY | VOLUME 11 | DECEMBER 2012 | 909



A GUIDE TO DRUG DISCOVERY — OPINION

Reducing safety-related drug attrition: the use of *in vitro* pharmacological profiling

Joanne Bowes, Andrew J. Brown, Jacques Hamon, Wolfgang Jarolimek, Arun Sridhar, Gareth Waldron and Steven Whitebread



eurofins

Cerep
Panlabs

SAFETYSCREEN 44

Seletividade (*em termos de segurança*)

Terapêutica

Farmacocinética (distribuição; Tempo de residência)

Farmacodinâmica: afinidade relativa: alvo – não alvo
(estratégia: *alosterismo, seletividade funcional*)

Quanto seria **suficientemente** seguro ?

Seletividade (em termos de segurança)

Farmacodinâmica:

Quanto seria *suficientemente* seguro ?

1. Razão de K_i 's

$$K_i \text{ (não alvo)} / K_i \text{ (alvo)} \geq 100 \text{ (hERG)}$$

2. Razão CI_{50} (off-target) – C_{max} (C_{pmax} livre após dose eficaz)

$$CI_{50} / C_{max} > 30 \text{ (hERG)}$$

Outros ensaios precoces *in vitro* para assegurar segurança

Células em cultura:

1. Hepatotoxicidade: células Hep G2

Sem efeito em concentração = 50 x CE-Cl₅₀

2. Citotoxicidade: linhagem celular relevante

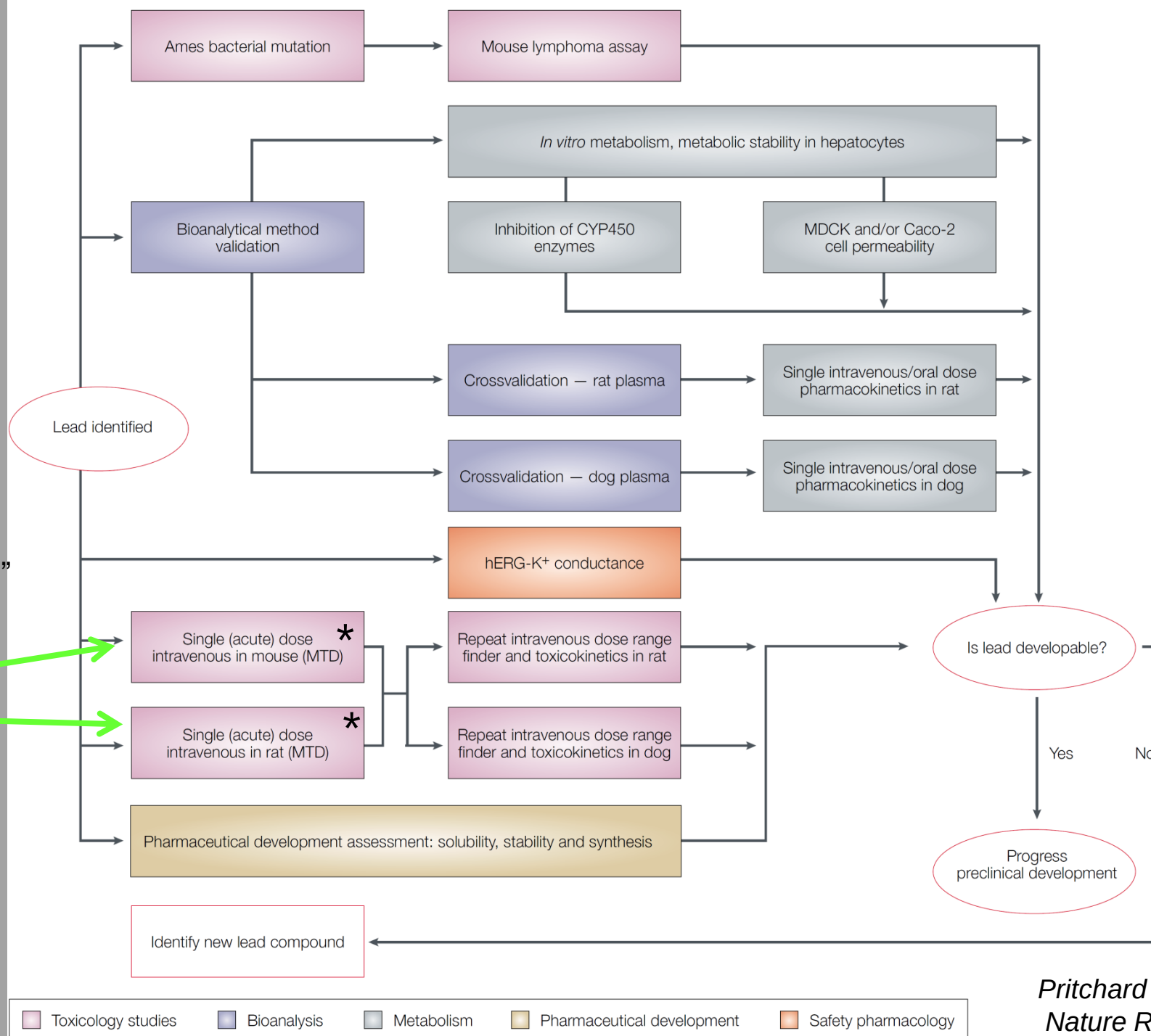
Sem efeito em concentração = 50 x CE-Cl₅₀

1. Is lead developable ?

"= Lead optimization"

*alternativas

MTD via
Escalonamento
de doses



Toxicologia *in vivo*

1. Toxicidade aguda: Dose única (Não mais “obrigatório”)

- Duas espécies: roedor + não roedor
- Uma única dose/animal (ou até 3 doses, administradas durante um período não superior a 24 horas) → **MTD** (até 1g/Kg-FDA).
(alternativa: *escaloneamento de doses (DRF:14 dias) – ICH, 2010*)
- Pelo menos duas vias da administração:
 - via preconizada para o uso em humanos
 - via que garanta pleno acesso à circulação sistêmica (i.v.).
- Observação por 14 dias + exame macroscópico das vísceras após sacrifício

Table 1. Routine exploratory safety studies

In silico

Genetic toxicology

SAR alerts using *in silico* tools

Mutagenicity assay: Bacterial reverse mutation

Clastogenicity assay: *in vitro* mammalian cell assay

Safety pharmacology

In vitro: Receptor binding, Ion channel assays

Ex vivo: Tissue/organ studies

In vivo: cardiovascular, neurobehavioral and respiratory studies

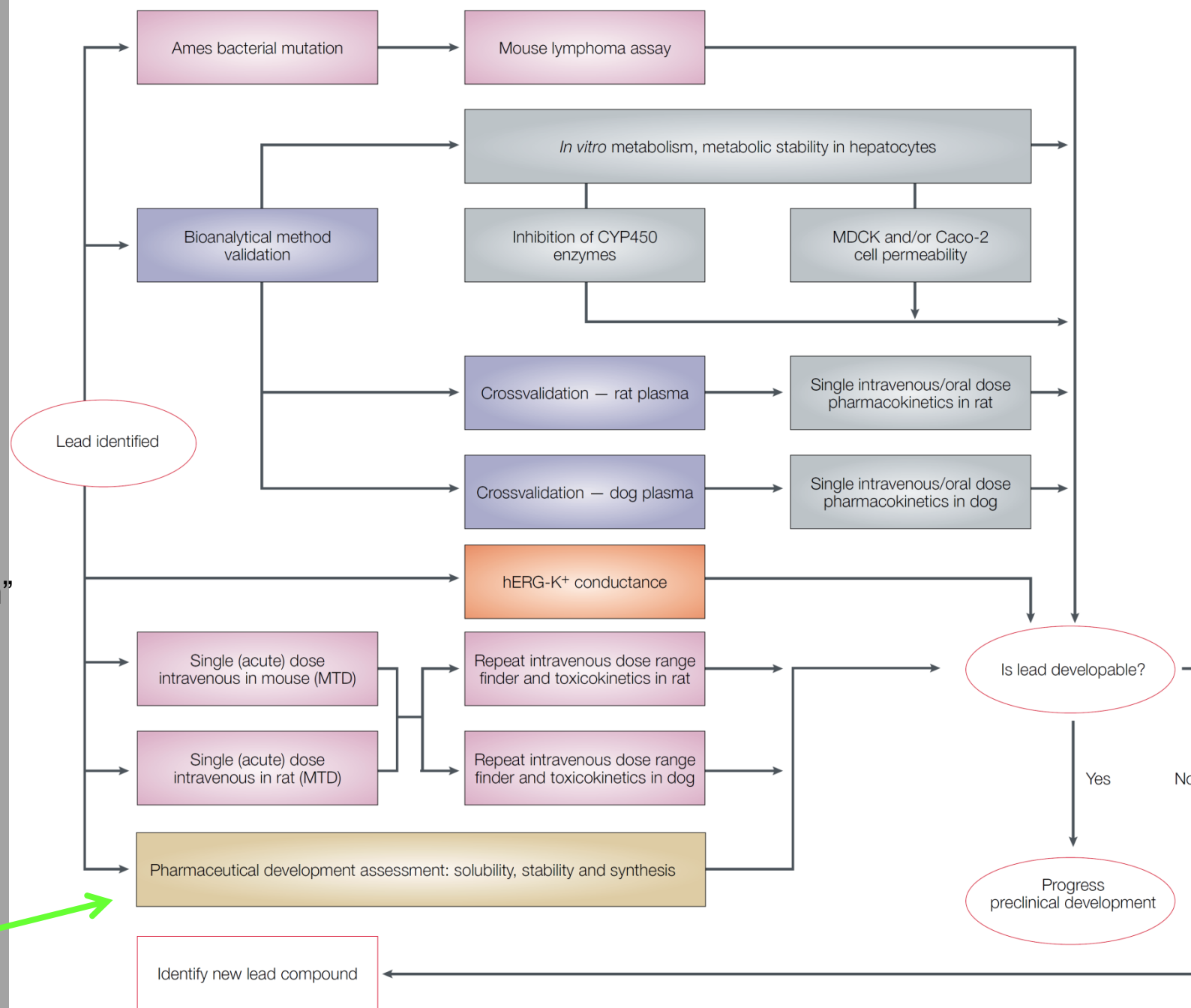
General toxicology

Rodent and Non-rodent: MTD and DRF studies

MTD, maximal tolerated dose; DRF, dose-range finding.

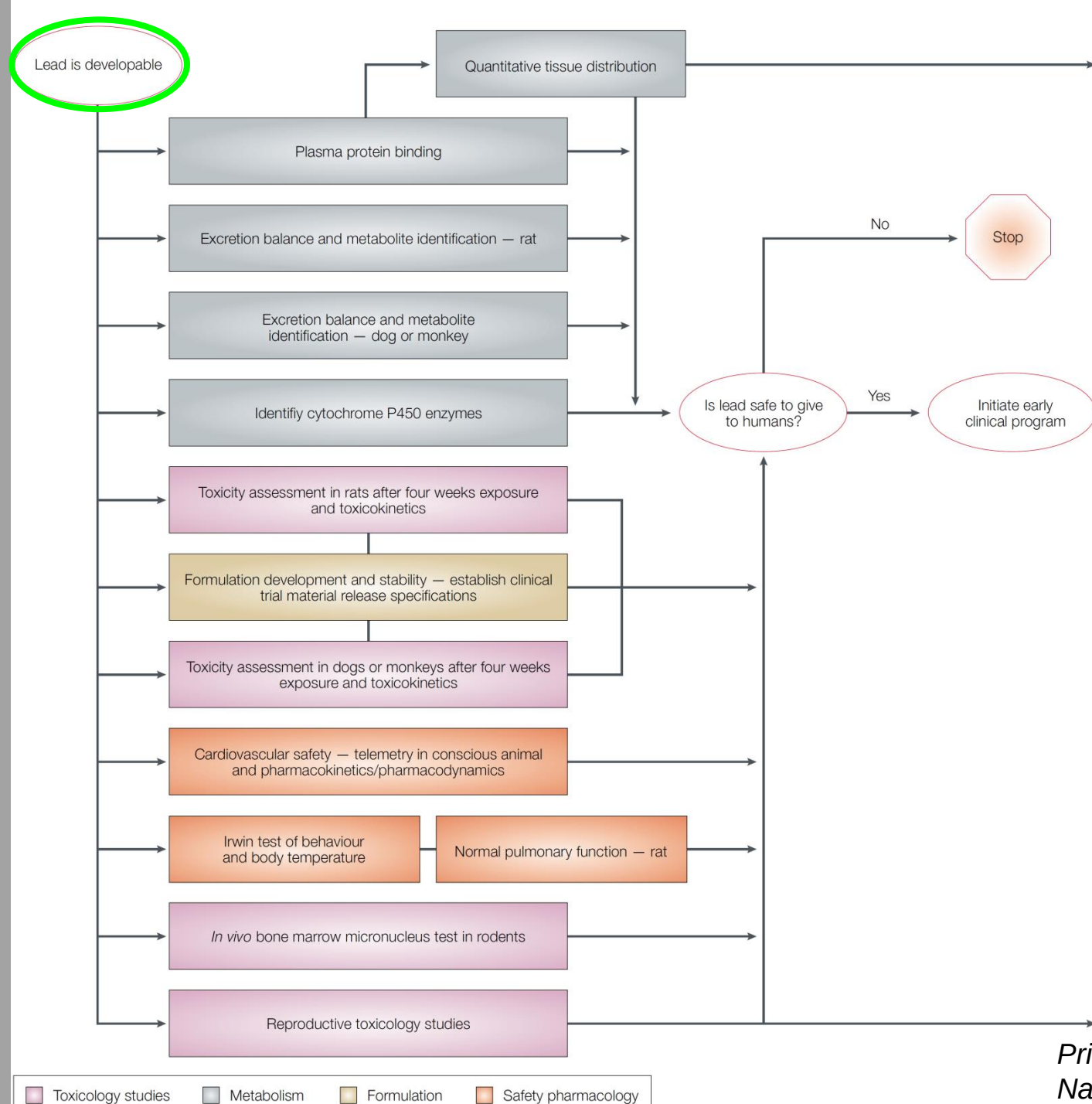
1. Is lead developable ?

"= Lead optimization"



2. Is lead safe for human ?

“= preclinical studies for proposing a Drug Candidate”



Distribuição e Metabolismo *in vivo*

I. DISTRIBUIÇÃO

- quantitativa, nos tecidos (fármaco radioativo)

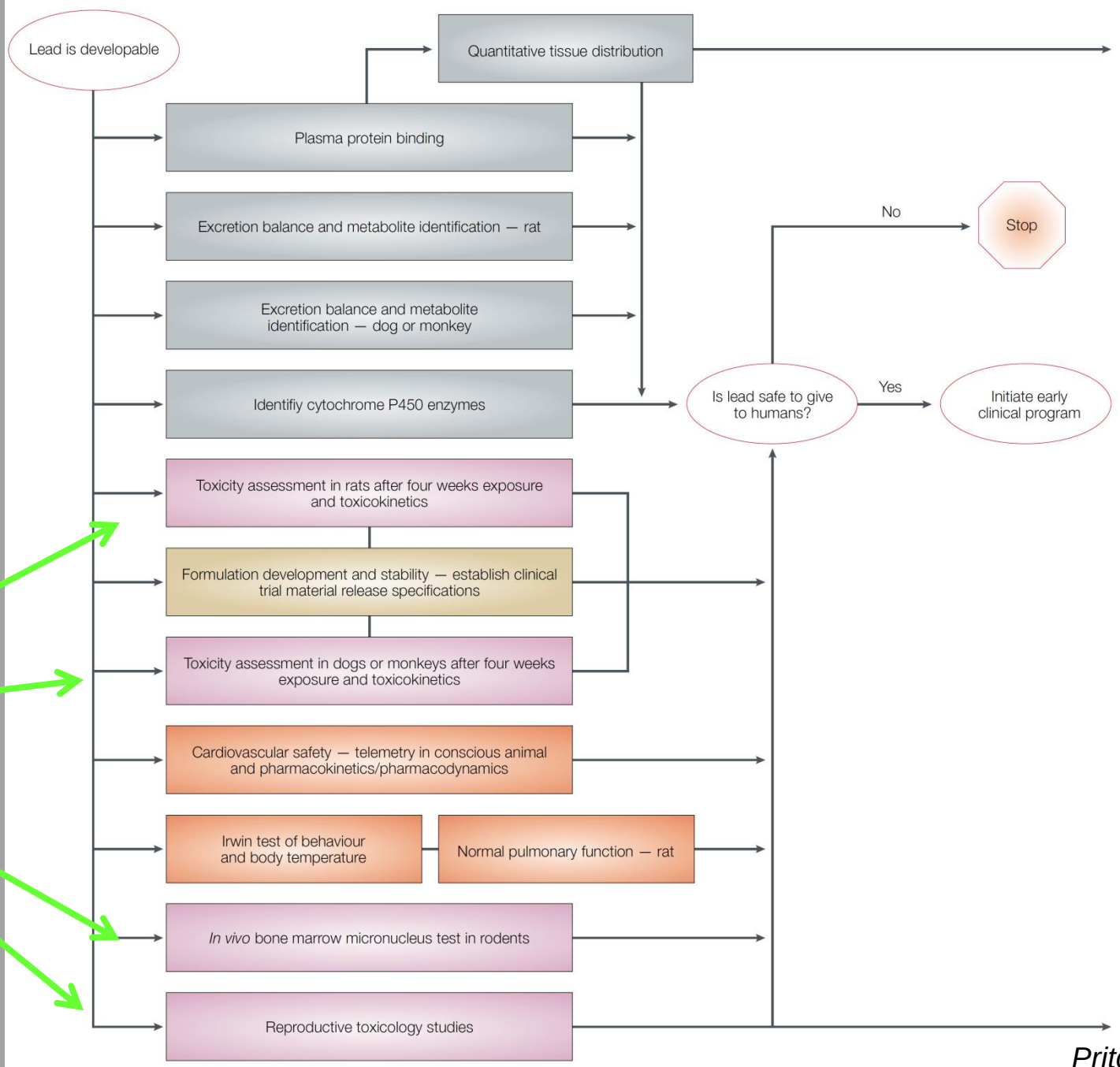
II. METABOLISMO

Rato e cachorro/macaco

- Balanço de excreção
- Metabolismo: identificação metabólitos
identificação dos CYPs

“= preclinical studies for proposing a Drug Candidate”

2. Is lead safe for human ?



Toxicologia *in vivo*: subcrônica (doses repetidas)

OECD Guidelines # 407 (2008)

Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents

1. Doses diferentes (pelo menos 3 doses + 1 controle) são administradas diariamente a diferentes grupos de animais (≥ 10 animais /grupo), por via oral.
2. Se deve usar a mesma formulação a ser empregada para tratar indivíduos durante os estudos clínicos.
3. Este estudo permite estabelecer a relação dose-resposta tóxica e a determinação do **NOAEL**



ANVISA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Gerência de Avaliação de Segurança e
Eficácia – GESEF

GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2

Toxicologia *in vivo*: sub-crônico (doses repetidas)

Duas espécies: Rato + cachorro / macaco

Toxicologia sub-crônica

Período de intervenção na pesquisa clínica	Duração mínima dos estudos de toxicidade de doses repetidas (para autorização ensaios clínicos)	
	Roedores	Não roedores
	Até 2 semanas	2 semanas
	Entre 2 semanas e 6 meses	Mesma duração da pesquisa clínica
	Acima de 6 meses	9 meses

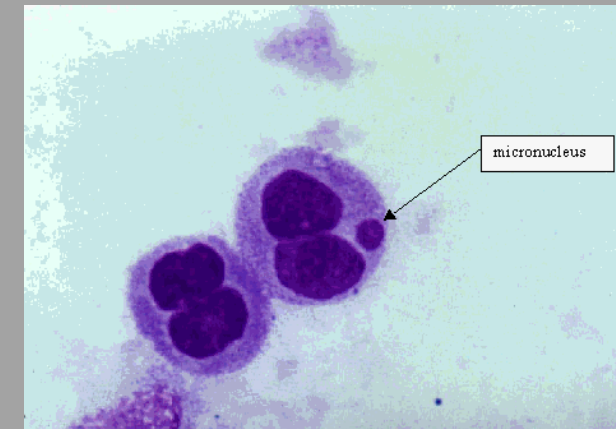
Toxicologia *in vivo*: sub-crônico (doses repetidas)

Duas espécies: Rato + cachorro / macaco
Toxicologia sub-crônica

Período de tratamento pós-registro	Duração mínima dos estudos de toxicidade de doses repetidas (<i>para registro</i>)	
	Roedores	Não roedores
Até 2 semanas	4 semanas	4 semanas
Entre 2 e 4 semanas	3 meses	3 meses
Entre 1 e 3 meses	6 meses	6 meses
> 3 meses	6 meses	9 meses

Table 3. Standard genotoxicity testing battery (Custer and Sweder, 2008)

Test	Purpose
Ames bacterial mutation assay	Evaluation of Gene mutation
Mouse lymphoma assay (MLA), Chinese hamster ovary (CHO) chromosomal aberration assay	Evaluation of chromosomal damage
<u>Micronucleus test (MNT)</u>	Evaluation of in vivo chromosomal damage in bone marrow polychromatic erythrocytes



CARCINOGENICIDADE

- Quando?

Fármacos a serem usados de forma crônica (> 6 meses)

- Como?

Estudo durante **18-24 meses** (*1 milhão de US\$*)

Estudo não clínico (durante os estudos clínicos)

Is lead safe for human ?

“= preclinical studies for proposing a Drug Candidate”

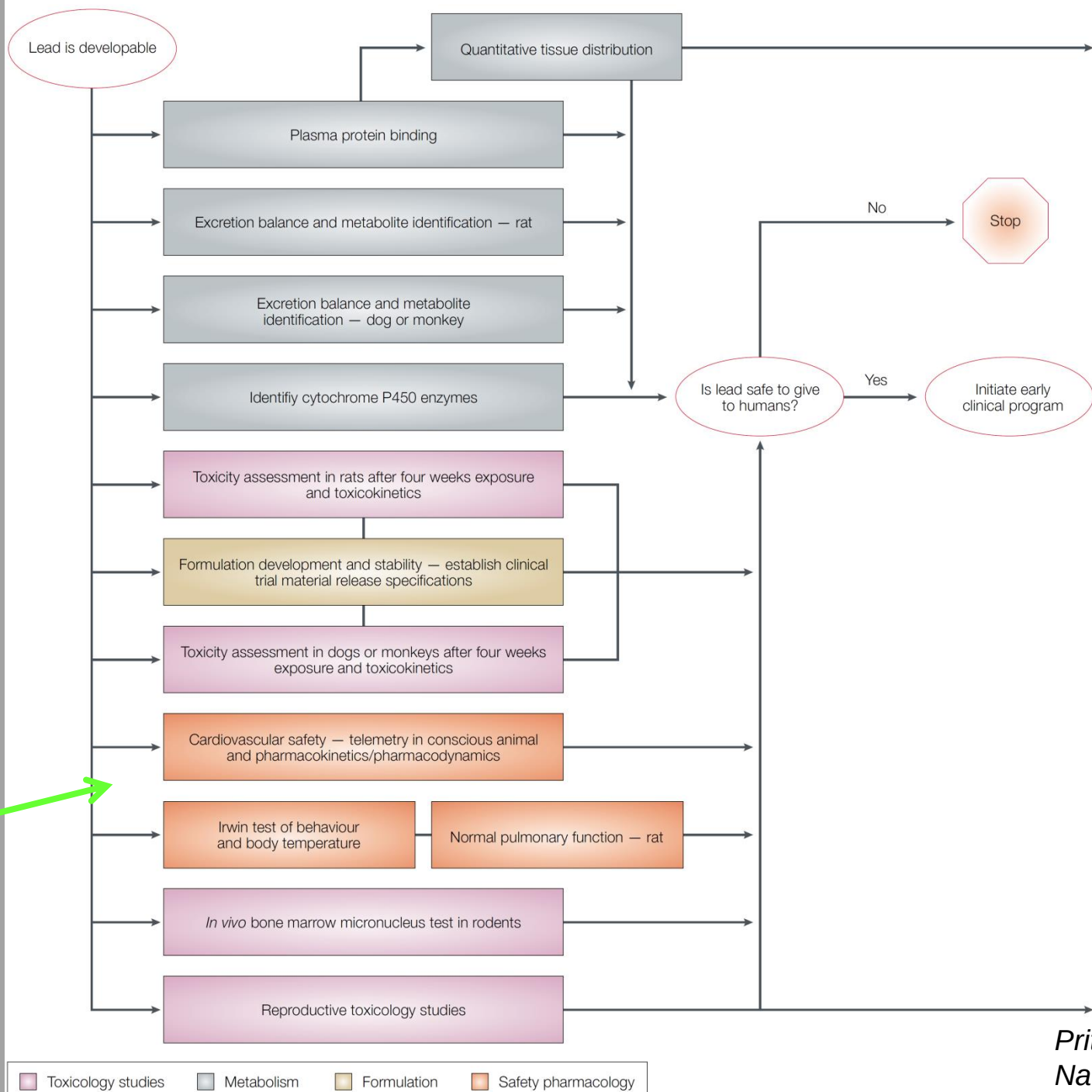


Table 1. Routine exploratory safety studies

In silico

Genetic toxicology

SAR alerts using *in silico* tools

Mutagenicity assay: Bacterial reverse mutation

Clastogenicity assay: *in vitro* mammalian cell assay

Safety pharmacology

In vitro: Receptor binding, Ion channel assays

Ex vivo: Tissue/organ studies

In vivo: cardiovascular, neurobehavioral and respiratory studies

General toxicology

Rodent and Non-rodent: MTD and DRF studies

MTD, maximal tolerated dose; DRF, dose-range finding.

SEGURANÇA: critérios importantes

SEVERITY (Gravidade)

REVERSIBILITY (Reversibilidade)

PREDICTIBILITY (dose-dependência)

!! O nível de exigência depende muito do tipo de doença
(*ex: câncer vs aterosclerose*)

Table 4. Tests and parameters available to assess cardiovascular system (CVS), central nervous system (CNS) and respiratory function in safety pharmacology studies (Hamdam *et al.*, 2013)

Core	Follow-up	Established techniques	Emerging techniques
CVS assessment -hERG, -Telemetry	Isolated organ preparation	-hERG, assays for other ion channels -Isolated organ preparation: Whole heart preparation, Isolated Purkinje fibres -Telemetry	-Human embryonic stem cell derived cardiomyocytes -Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes -High definition oscillometry
CNS assessment -Behavior -Locomotor activity -Motor co-ordination -Sensorimotor reflexes: nociception	-Higher cognitive function -Seizure liability -Drug abuse and dependence	-Modified Irwin's test, Functional Observation Battery (FOB) -Photoelectric beam interruption systems -Rotarod -Hot plate test, Tail flick, paw pressure -Morris maize and passive avoidance tests -Electrocerebral silence threshold and PTZ seizure tests -EEG -Self administration and drug discrimination lever chamber models -Drug withdrawal: FOB, body temperature, body weight	-Integrated video and EEG systems -<i>In vitro</i> hippocampal brain slice assay -Telemetry
Respiratory function assessment -Respiratory rate -Tidal volume -Hemoglobin oxygen saturation	-Airway resistance -Pulmonary arterial pressure -Compliance	-Plethysmography	-Unrestrained video-assisted plethysmography -Telemetry

Mainly *In vivo* assays

Table 4. Tests and parameters available to assess cardiovascular system (CVS), central nervous system (CNS) and respiratory function in safety pharmacology studies (Hamdam *et al.*, 2013)

Core	Follow-up	Established techniques	Emerging techniques
CVS assessment -hERG, -Telemetry	Isolated organ preparation	-hERG, assays for other ion channels -Isolated organ preparation: Whole heart preparation, Isolated Purkinje fibres -Telemetry	-Human embryonic stem cell derived cardiomyocytes -Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes -High definition oscillometry
CNS assessment -Behavior -Locomotor activity -Motor co-ordination -Sensorimotor reflexes: nociception	-Higher cognitive function -Seizure liability -Drug abuse and dependence	-Modified Irwin's test, Functional Observation Battery (FOB) -Photoelectric beam interruption systems -Rotarod -Hot plate test, Tail flick, paw pressure -Morris maize and passive avoidance tests -Electrocerebral silence threshold and PTZ seizure tests -EEG -Self administration and drug discrimination lever chamber models -Drug withdrawal: FOB, body temperature, body weight	-Integrated video and EEG systems -<i>In vitro</i> hippocampal brain slice assay -Telemetry
Respiratory function assessment -Respiratory rate -Tidal volume -Hemoglobin oxygen saturation	-Airway resistance -Pulmonary arterial pressure -Compliance	-Plethysmography	-Unrestrained video-assisted plethysmography -Telemetry

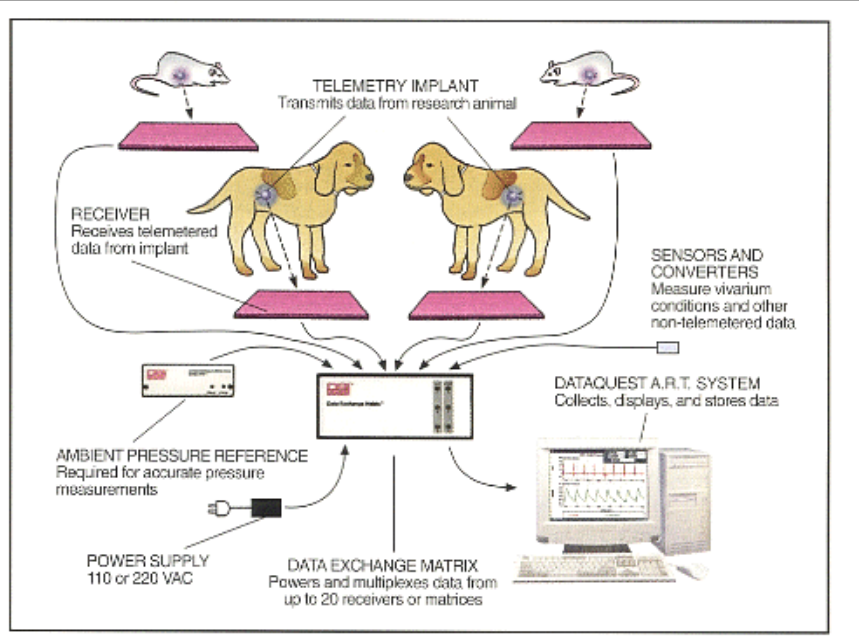


Table 4. Tests and parameters available to assess cardiovascular system (CVS), central nervous system (CNS) and respiratory function in safety pharmacology studies (Hamdam *et al.*, 2013)

Core	Follow-up	Established techniques	Emerging techniques
CVS assessment -hERG, -Telemetry	Isolated organ preparation	-hERG, assays for other ion channels -Isolated organ preparation: Whole heart preparation, Isolated Purkinje fibres -Telemetry	-Human embryonic stem cell derived cardiomyocytes -Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes -High definition oscillometry
CNS assessment -Behavior -Locomotor activity -Motor co-ordination -Sensorimotor reflexes: nociception	-Higher cognitive function -Seizure liability -Drug abuse and dependence	-Modified Irwin's test, Functional Observation Battery (FOB) -Photoelectric beam interruption systems -Rotarod -Hot plate test, Tail flick, paw pressure -Morris maize and passive avoidance tests -Electrocerebral silence threshold and PTZ seizure tests -EEG -Self administration and drug discrimination lever chamber models -Drug withdrawal: FOB, body temperature, body weight	-Integrated video and EEG systems -<i>In vitro</i> hippocampal brain slice assay -Telemetry
Respiratory function assessment -Respiratory rate -Tidal volume -Hemoglobin oxygen saturation	-Airway resistance -Pulmonary arterial pressure -Compliance	-Plethysmography	-Unrestrained video-assisted plethysmography -Telemetry

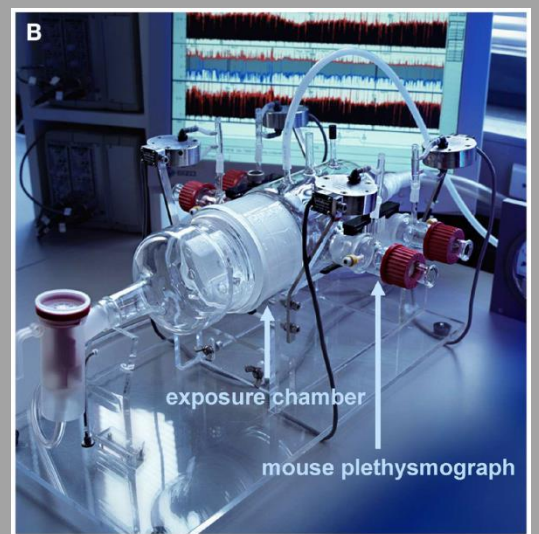
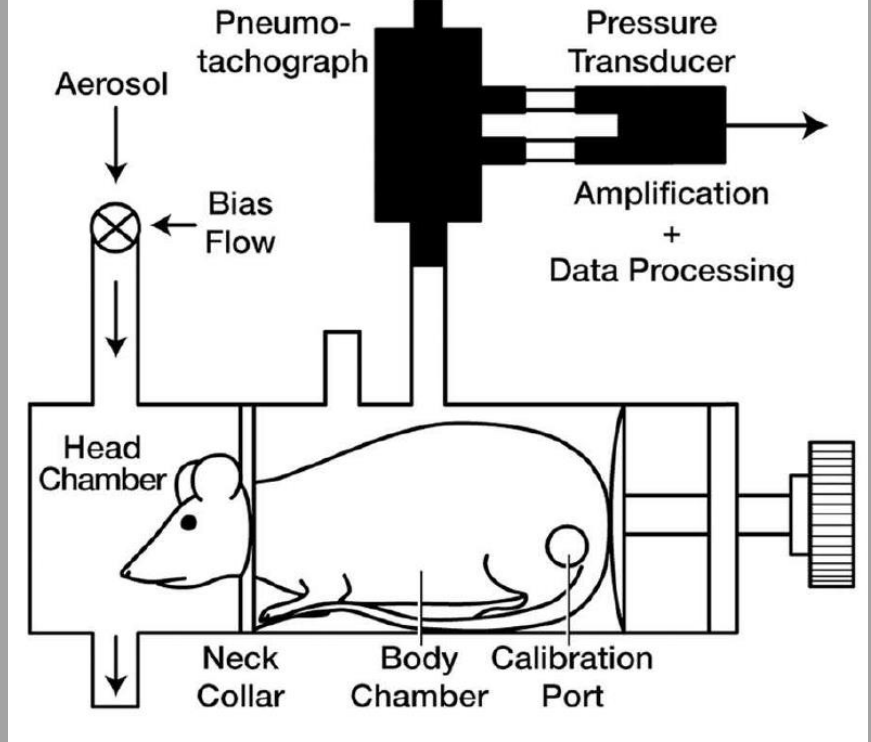


Teste de Irwin modificado & bateria de observação funcional: parâmetros avaliados

Autonomic nervous system	Sensorimotor	Neuromuscular	Behavioural
Salivation	Approach response	Posture	Arousal
Lacrimation	Grasping reflex	Gait	Vocalisation
Piloerection	Pupil response	Muscle tone	Handling reactivity
Excessive urination	Tail pinch/tail flick response	Grip strength	Stereotypy
Diarrhoea/loose faeces	Palpebral reflex	Tremor	Bizarre behaviour
Respiration	Startle/righting reflex	Shivering	Grooming
Rectal temperature	Landing foot splay	Convulsions	(Un)supported rears

Table 4. Tests and parameters available to assess cardiovascular system (CVS), central nervous system (CNS) and respiratory function in safety pharmacology studies (Hamdam *et al.*, 2013)

Core	Follow-up	Established techniques	Emerging techniques
CVS assessment -hERG, -Telemetry	Isolated organ preparation	-hERG, assays for other ion channels -Isolated organ preparation: Whole heart preparation, Isolated Purkinje fibres -Telemetry	-Human embryonic stem cell derived cardiomyocytes -Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes -High definition oscillometry
CNS assessment -Behavior -Locomotor activity -Motor co-ordination -Sensorimotor reflexes: nociception	-Higher cognitive function -Seizure liability -Drug abuse and dependence	-Modified Irwin's test, Functional Observation Battery (FOB) -Photoelectric beam interruption systems -Rotarod -Hot plate test, Tail flick, paw pressure -Morris maize and passive avoidance tests -Electrocerebral silence threshold and PTZ seizure tests -EEG -Self administration and drug discrimination lever chamber models -Drug withdrawal: FOB, body temperature, body weight	-Integrated video and EEG systems -<i>In vitro</i> hippocampal brain slice assay -Telemetry
Respiratory function assessment -Respiratory rate -Tidal volume -Hemoglobin oxygen saturation	-Airway resistance -Pulmonary arterial pressure -Compliance	Plethysmography	-Unrestrained video-assisted plethysmography -Telemetry



INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL
REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

SAFETY PHARMACOLOGY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS
S7A

Current *Step 4* version

dated 8 November 2000

Non-clinical studies for the conduct of human clinical trials

IND

Non-clinical studies during human clinical trials

NDA

Exploratory studies

GLP studies

Pharmacokinetics

Toxicology
(4 weeks)
(2 species)

Toxicology
(Dose escalation)
(2 weeks)

Genotoxicity
(*in vitro/in vivo*)

Genotoxicity
(*in vitro*)

Toxicokinetics

Safety Pharmacology

Safety Pharmacology

Efficacy Studies

Reproductive Toxicology
(Teratology/Female fertility)

ADME (*in vitro/in vivo/in silico*)

Phase I

Phase II

Phase III

Toxicology
(3 - 6 months)

Reproductive Toxicology
(Male fertility/Pre and Postnatal development)

Chronic Toxicology > 6 months

Carcinogenicity

Non-clinical studies in the process of new drug development – Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies

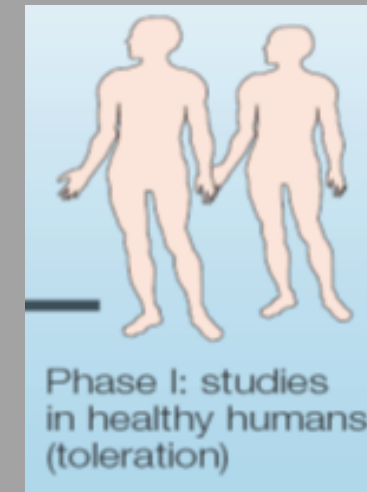
E.L. Andrade*, A.F. Bento*, J. Cavalli, S.K. Oliveira, R.C. Schwanke, J.M. Siqueira, C.S. Freitas, R. Marcon and J.B. Calixto

Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos, Florianópolis, SC, Brasil

Fonte interessante para diferentes Guidelines atuais

ENSAIO CLÍNICO DE FASE I

- Primeiro estudo envolvendo seres humanos com novo fármaco (ou formulação)
- Pequeno grupo de voluntários: 20-80
- Voluntários **SADIOS** (geralmente)
- Não controlado, nem cego
- Várias doses
- 4 semanas



OBJETIVOS:

1. avaliação preliminar da **SEGURANÇA** (*e não eficácia*)
2. PERFIL FARMACOCINÉTICO
3. Perfil farmacodinâmico (*se possível: POC precoce*)

Dose ? (MRSD = *Maximum Recommended Starting Dose*)

“Baseada” na NOAEL

1/10 x dose equivalente a NOAEL (FDA recommendation)

1/25-30 x para PD-relevant toxicity

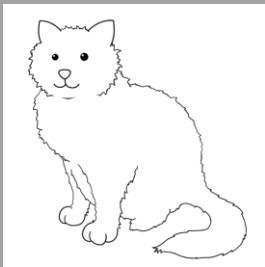
(*dica* < Novartis IUPHAR course)

Conceito de ALOMETRIA

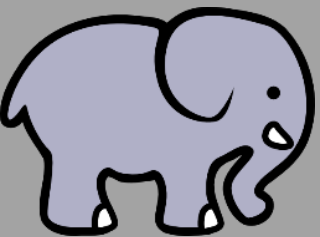
ramo da biologia que estuda relações de escala para atributos, eg fisiológicos

Podemos escalonar doses de fármaco entre espécie
Somente baseado no peso ?

1962: Shot of drug kills Tusko,
a 14-year-old male Indian elephant



Dose = 0,15 mg/Kg

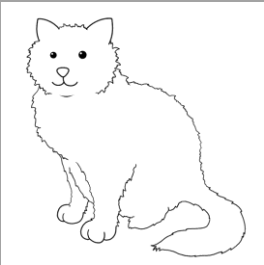


Dose = 0,1 mg/Kg

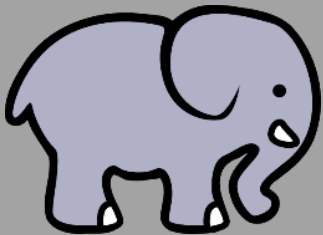


297 mg
de LSD

1962: Shot of drug kills Tusko, a 14-year-old male Indian elephant



Dose = 0,15 mg/Kg



Dose = 0,1 mg/Kg



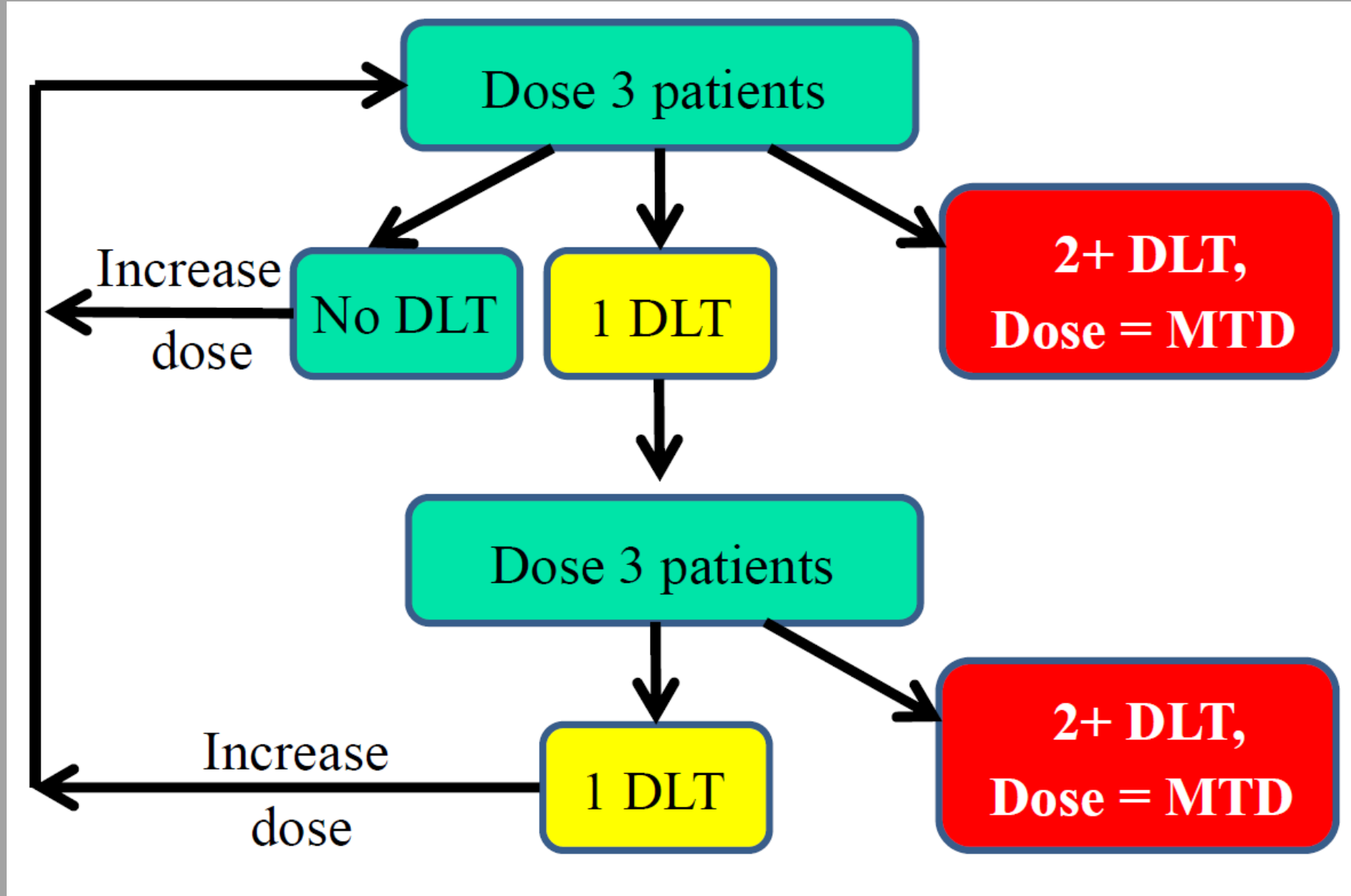
297 mg
de LSD



Table 1: Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses			
Based on Body Surface Area			
Species	To Convert Animal Dose in mg/kg to Dose in mg/m ² , Multiply by k _m	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED ^a in mg/kg, Either:	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
Human	37	---	---
Child (20 kg) ^b	25	---	---
Mouse	3	12.3	0.08
Hamster	5	7.4	0.13
Rat	6	6.2	0.16
Ferret	7	5.3	0.19
Guinea pig	8	4.6	0.22
Rabbit	12	3.1	0.32
Dog	20	1.8	0.54
Primates:			
Monkeys ^c	12	3.1	0.32
Marmoset	6	6.2	0.16
Squirrel monkey	7	5.3	0.19
Baboon	20	1.8	0.54
Micro-pig	27	1.4	0.73
Mini-pig	35	1.1	0.95

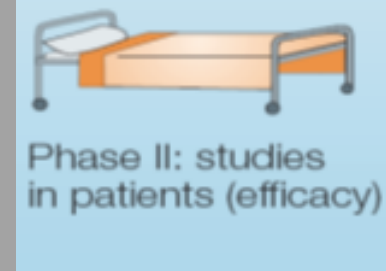
ENSAIO TÍPICO DE FASE I: **single ascending dose study**

DLT:
Dose
Limiting
Toxicity



ENSAIO CLÍNICO DE FASE II

- Estudo terapêutico piloto
- Pequeno grupo de **PACIENTES**: 100-300
- Estudo controlado e duplo-cego
- Duas etapas: IIA: PoC (prova de conceito)
IIB: refinar: curva dose-efeito

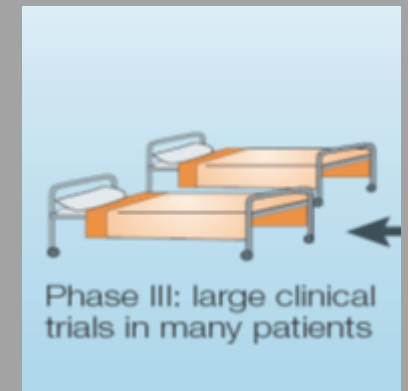


OBJETIVOS:

1. Demonstrar **EFICÁCIA** (**dose mínima eficaz ?**) = **PoCo** (IIA)
2. **SEGURANÇA A CURTO PRAZO**, em pacientes com uma determinada enfermidade
3. Estabelecer relação dose-resposta (IIB)

ENSAIO CLÍNICO DE FASE III

- Estudo terapêutico ampliado
- Grupos grandes e variados de PACIENTES
(estudos multicêntricos): 1000-5000



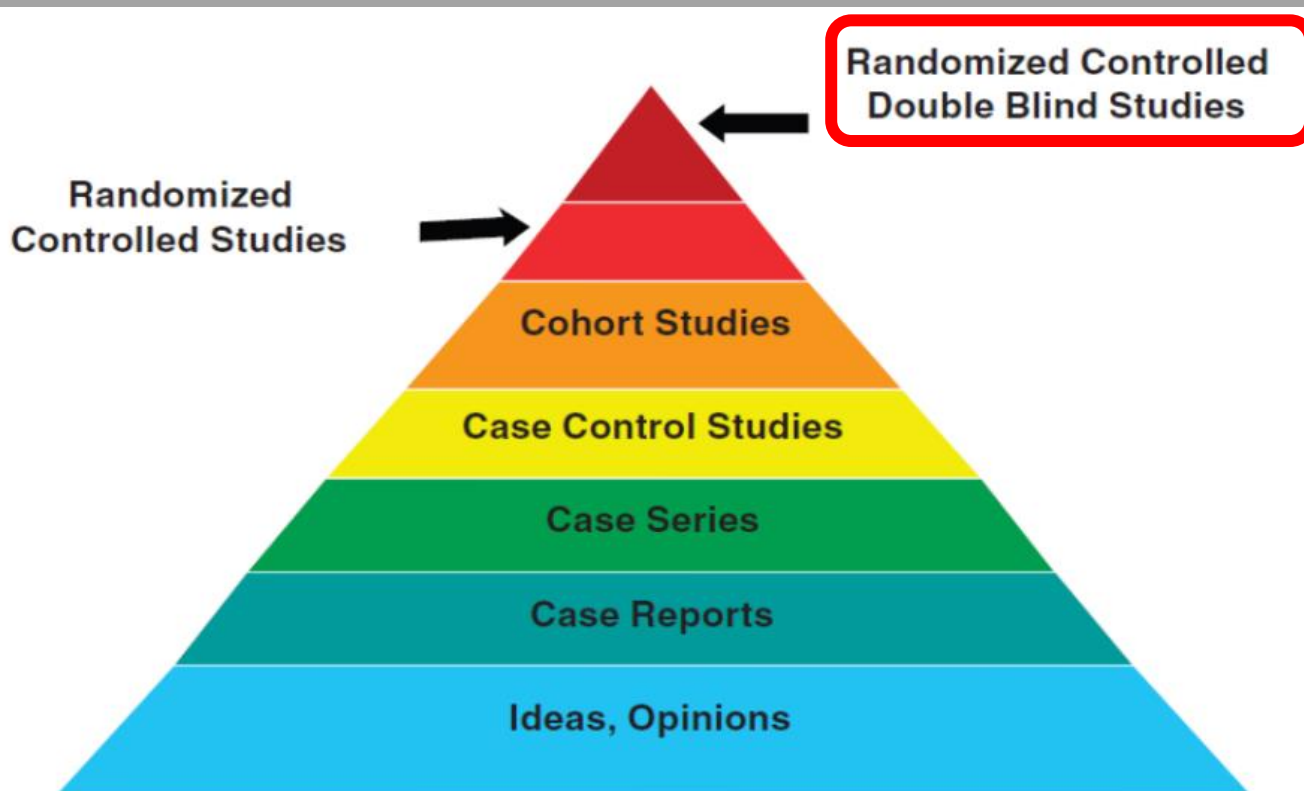
OBJETIVOS:

1. Avaliar RISCO-BENEFÍCIO (eficácia e segurança) a curto e LONGO prazo
2. Estabelecer valor terapêutico absoluto e relativo
3. Tipo e perfil das reações adversas mais freqüentes
4. Condições mais próximas possíveis das condições de uso normal

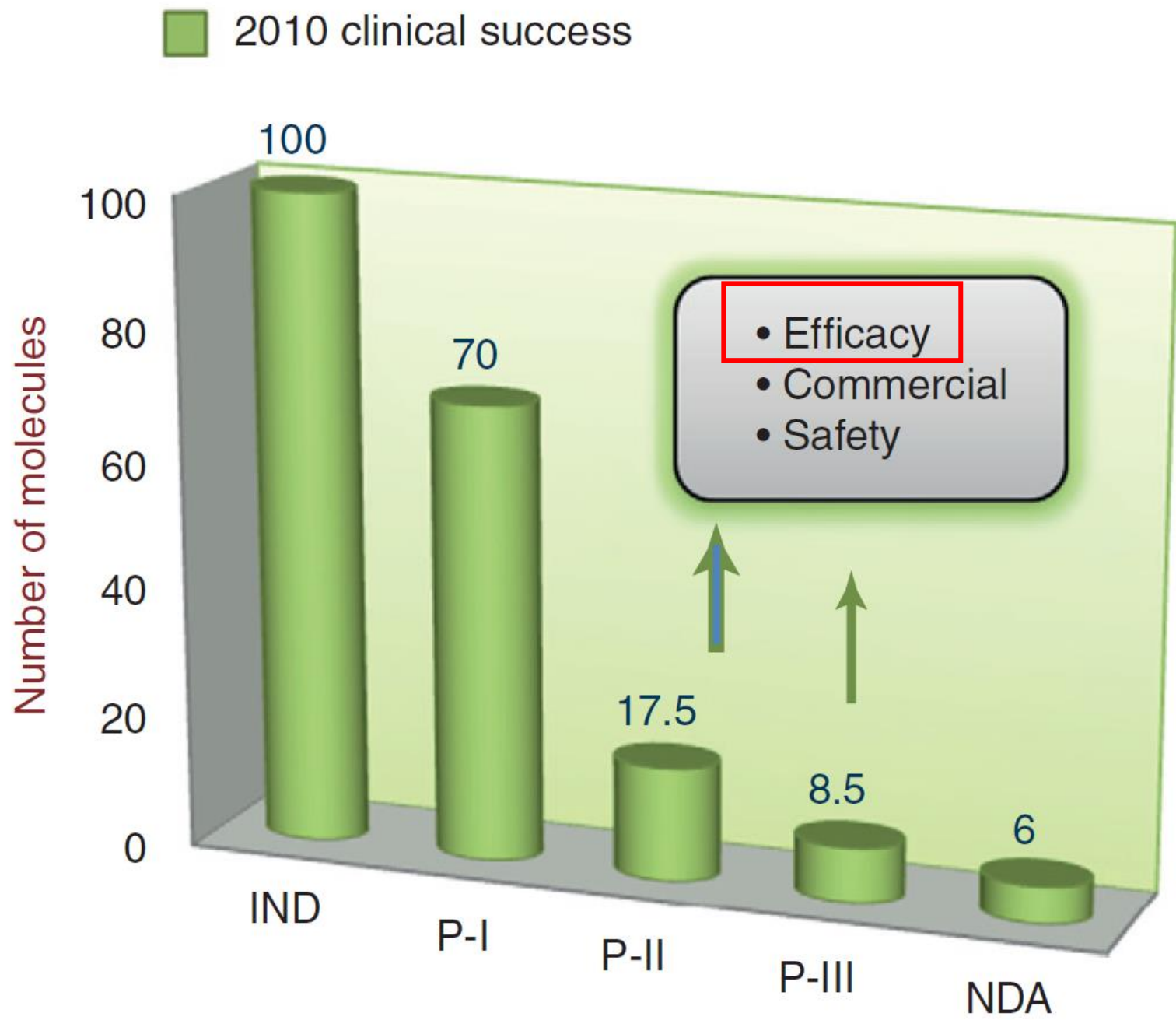
Medicina Baseada em Evidências (Dr. Sackett, 1996)

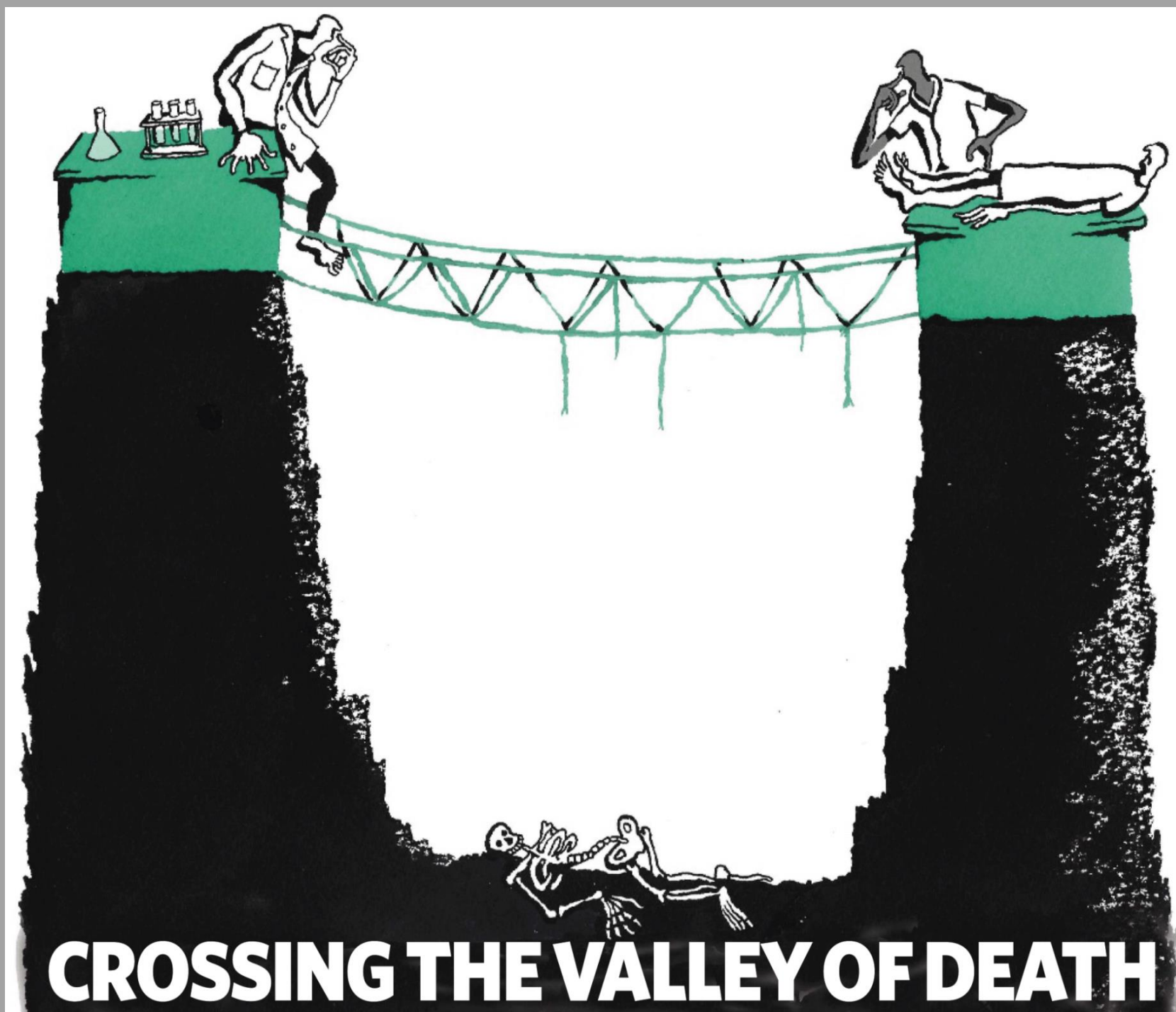
*“O uso consciente, explícito e criterioso das **melhores evidências atuais** na tomada de decisões sobre o atendimento de pacientes individuais”.*

“Padrão ouro” atual para julgar a eficácia e segurança de um tratamento



Estudos Clínicos Controlados
e Randomizados realizados
em duplo-cego





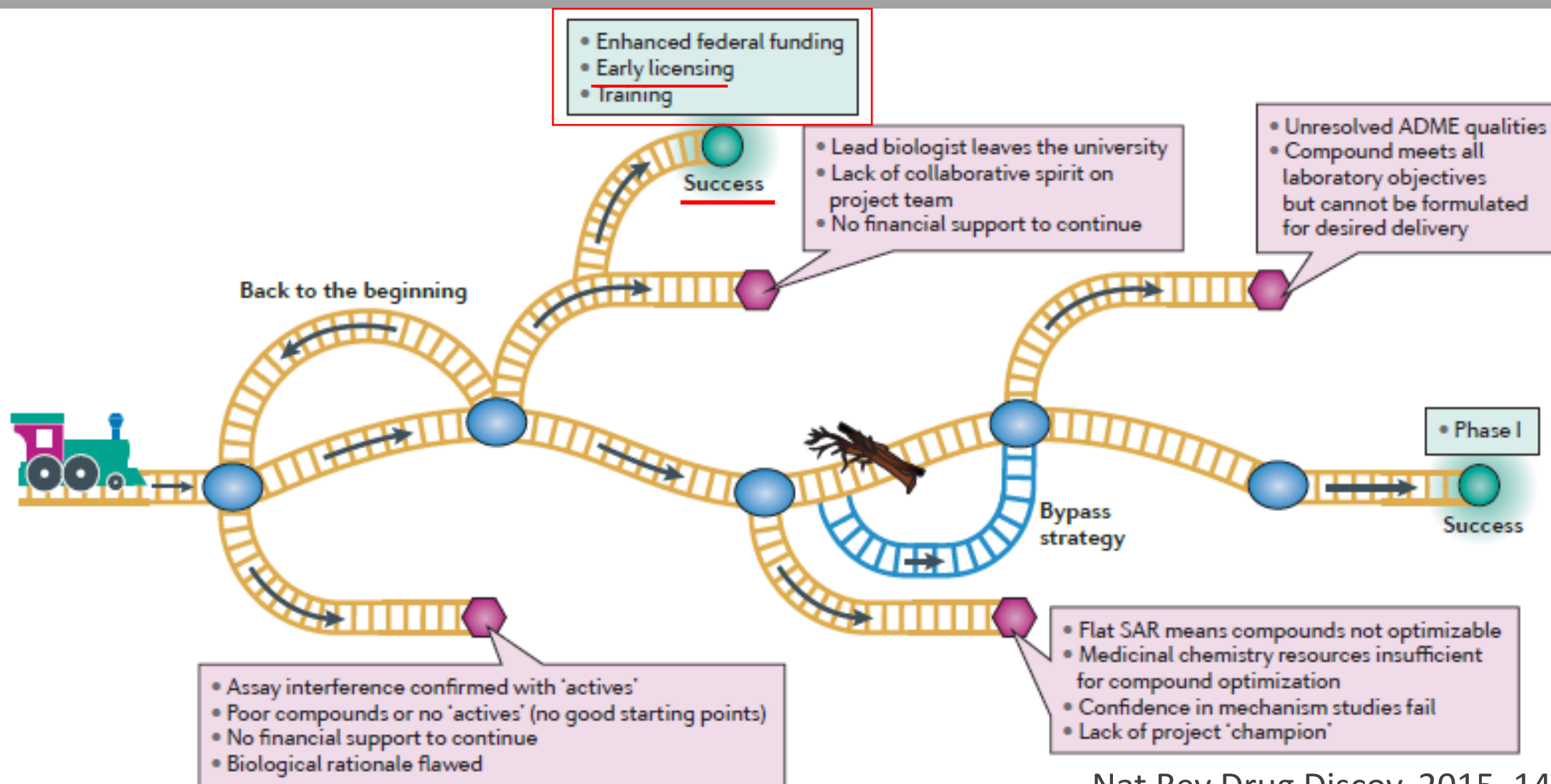
Não é fácil atravessar a ponte



René Magritte - A ponte de Heráclito (1935)

Mitigating risk in academic preclinical drug discovery

Jayme L. Dahlin¹, James Inglese^{2,3} and Michael A. Walters⁴



Receita par ter sucesso

Regra dos 4 Gs:

“ Geist, Geld, Geduld, und Glick ”

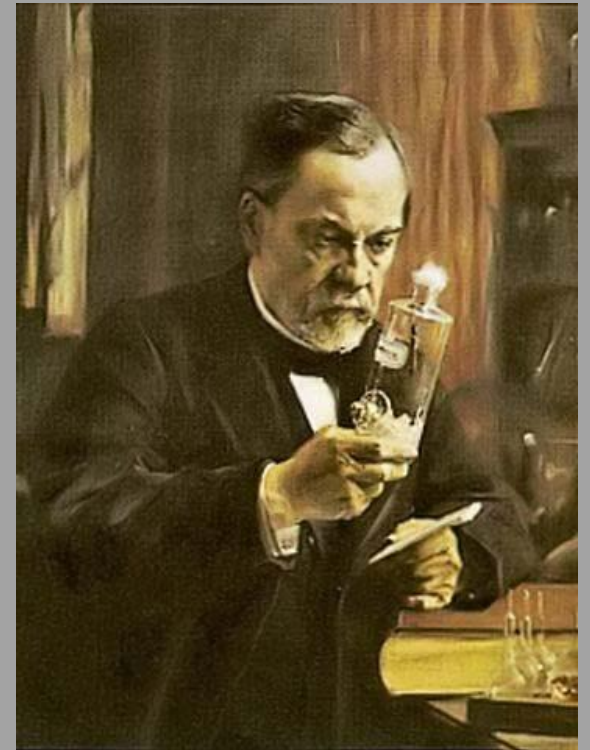
Boa ideia, Dinheiro, Paciência e Chance



Paul Ehrlich
(1854-1915)

*“La chance ne sourit qu’aux esprits
préparés”*

A sorte só favorece as mentes
preparadas



Louis Pasteur
(1822-1895)

...e no caso de programa de Descoberta de novos candidatos a fármacos ?

Liderança e trabalho em equipe

